BEST AVAILABLE COPY

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year): 28 October 1997 (28.10.97)	
International application No.: PCT/ES97/00059	Applicant's or agent's file reference: PCT 1/97
International filing date (day/month/year): 12 March 1997 (12.03.97)	Priority date (day/month/year): 14 March 1996 (14.03.96)

Applicant: ENJUANES SANCHEZ, Luis et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

[X] in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on: 13 October 1997 (13.10.97)

[] in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election [X] was

[] was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Eugénia Santos
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Form PCT/IB/331 (July 1992)

1737701

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.
PCT.1/97		
International application No.	International filing date (day/month/year)	(Earliest) Priority Date (day/month/year)
PCT/ES 97/00059	12/03/1997	14/03/1996
Applicant		
CYANAMID IBERICA, S.A. et al.		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 4 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. [] **Certain claims were found unsearchable** (see Box I).

2. [] **Unity of invention is lacking** (see Box II).

3. [X] The international application contains disclosure of a **nucleotide and/or amino acid sequence listing** and the international search was carried out on the basis of the sequence listing
 - [X] filed with the international application.
 - [] furnished by the applicant separately from the international application,
 - [] but not accompanied by a statement to the effect that it did not include matter going beyond the disclosure in the international application as filed.
 - [] Transcribed by this Authority

4. With regard to the **title,**
 - [X] the text is approved as submitted by the applicant.
 - [] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract,**
 - [X] the text is approved as submitted by the applicant.
 - [] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this International Search Report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the **drawings** to be published with the abstract is:
 Figure No. _____
 - [] as suggested by the applicant.
 - [] because the applicant failed to suggest a figure.
 - [] because this figure better characterizes the invention.
 - [X] None of the figures.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ES 97/00059

A. CLASIFICACION DE LA INVENCION
CIP 6 C12N15/86 C12N7/01 A61K39/225 A61K39/215 A61K35/76

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
CIP 6 C12N C07K A61K

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	WO 91 03552 A (THE MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) 21 Marzo 1991	1,2, 6-12, 14-18, 20-25, 39,40
Y	Y ver página 11, línea 17 - página 12, línea 17 ver página 22, línea 10 - página 28, línea 7 ver página 29, línea 30 - página 36, línea 6 ver página 38, línea 1 - página 43, línea 35; ejemplo 7 --- -/--	28, 30-32, 34-36, 38-40,42

[X] En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales

[X] Véase el Anexo de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente

"E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma

"L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención

"X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente

"Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reinvindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

1

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional	Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional
2 Julio 1997	31.07.97

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional	Funcionario autorizado
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Montero Lopez, B

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (Julio de 1992)

C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	VIROLOGY, vol. 208, num. 1, 1 Abril 1995, ORLANDO US, páginas 319-327, XP002034204 GHING-LEN LIAO: "Coronavirus Defective-Interfering RNA as an expression vector: The generation of a pseudorecombinant Mouse Hepatitis Virus expressing Hemagglutinin-Esterase"	1-3,6,7, 11, 14-17, 20-24,44
Y	ver resumen ver página 319, columna derecha, párrafo 2 - página 320, columna izquierda, párrafo 2 ver página 321, columna derecha, párrafo 3 - página 324, columna izquierda, párrafo 1 ver página 325, columna izquierda, párrafo 1 - página 326, columna izquierda, párrafo 2	28, 30-32, 34-36, 38-40, 42,45

X	ADV. EXP. MED. BIOL. (1995), 380(CORONAVIRUSES), 583-9 CODEN: AEMBAP;ISSN: 0065-2598, 1995, XP002034205 MENDEZ, ANA ET AL: "Structure and encapsidation of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) defective interfering genomes" ver resumen ver página 585, párrafo 3 - página 588, párrafo 6	1,3-6

X	J. VIROL. (1991), 65(6), 3219-26 CODEN: JOVIAM;ISSN: 0022-538X, 1991, XP002034206 VAN DER MOST, ROBBERT G. ET AL: "A domain at the 3' end of the polymerase gene is essential for encapsidation of coronavirus defective interfering RNAs" ver resumen ver página 3220, columna derecha, ultimo párrafo - página 3225, columna derecha, párrafo 1	1,3,6

Y	WO 94 17098 A (INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA) 4 Agosto 1994 ver página 1, línea 17 - página 8, línea 7 ver página 9, párrafo 12 - página 15, párrafo 19; reivindicaciones	28, 30-32, 34-36, 38-40, 42,45

	-/--	

1

C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría°	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, num. 12, Diciembre 1994, páginas 8223-8231, XP002034207 RUEY-YI CHANG ET AL.: "A cis-acting function for the Coronavirus leader in defective interfering RNA replication" ver resumen ver página 8225, columna derecha, ultimo párrafo - página 8230, columna derecha, párrafo 2	1-45
P,X	VIROLOGY, vol. 217, num. 2, 15 Marzo 1996, ORLANDO US, páginas 495-507, XP002034208 ANA MENDEZ ET AL.: "Molecular characterization of transmissible gastroenteritis Coronavirus defective interfering genomes: Packaging and heterogeneity" ver resumen ver página 498, columna izquierda, ultimo párrafo - página 505, columna derecha, párrafo 4	1-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/ES 97/00059

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9103552 A	21-03-91	US 5166057 A	24-11-92
		AT 126272 T	15-08-95
		AU 636916 B	13-05-93
		AU 6411890 A	08-04-91
		DE 69021575 D	14-09-95
		DE 69021575 T	14-12-95
		EP 0490972 A	24-06-92
		ES 2075901 T	16-10-95
		GR 90100639 A	30-12-91
		JP 5500607 T	12-02-93
		US 5252289 A	12-10-93
		US 5578473 A	26-11-96
WO 9417098 A	04-08-94	ES 2065254 A	01-02-95
		ES 2089966 A	01-10-96
		AU 7004894 A	15-08-94
		CA 2132742 A	24-07-94
		EP 0647655 A	12-04-95
		NZ 259882 A	24-03-97

PATENT COOPERATION TREATY

[illegible] 3 SEP 1998
WIPO PCT

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (PCT/IPEA/416)
PCT.1/97		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/ES97/00059	12/03/1997	14/03/1996
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC		
C12N15/86		
Applicant		
CYANAMID IBERICA, S.A. et al.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

 ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

 These annexes consist of a total of sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

I	☒	Basis of the report
II	☒	Priority
III	☐	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV	☐	Lack of unity of invention
V	☒	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI	☐	Certain documents cited
VII	☐	Certain defects in the international application
VIII	☒	Certain observations on the international application

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
13/10/1997	03.07.98
Name and mailing address of the IPEA/	Authorized officer
European Patent Office D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0. Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Julia, P Telephone No. (+49-89) 2399-8410

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/ES97/00059

I. Basis of th r port

1. This report has been drawn on the basis of (*substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

Description, pages:

1-40 as originally filed

Claims, No.:

1-45 as originally filed

Drawings, sheets:

1/27-27/27 as originally filed

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages:
☐ the claims, Nos.:
☐ the drawings, sheets:

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have b en considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

4. Additional observations, if necessary:

II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:

 ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed.

 ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.

2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

see separate sheet

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	8,10,12-13,18-19,25-45
	No:	Claims	1-7,9,11,14-17,20-24
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	43
	No:	Claims	1-42,44-45
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-45
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

1. This international preliminary examination report (IPER) has been done considering the priority date 14.03.96 as a valid date. If it was not so the document Ana Mendez et al., Virology 1996, Vol. 217 (2), pages 495-507 would become relevant.

2. The present application discloses a defective viral genome (porcine, canine or feline coronavirus and in particular the virus of transmissible gastroenteritis of pigs TGEV) comprising the parental virus genome having viral replicase recognition signals located on ends 3' and 5', further comprising internal deletions and wherein said defective viral genome depends on a helper virus for its replication and encapsidation. The application further discloses expression vectors and recombinant systems based on said recombinant defective viral genome and comprising at least one antigen capable of inducing systemic and secretory immune responses or at least one antibody which confers protection against an infectious agent as well as vaccines comprising said recombinant systems. The generation of these defective viral genome is obtained by undiluted serial passages of the viral strain at high multiplicity of infection and further characterization and analysis of the new subgenomic RNAs (preservation of 5' and 3' ends of the wild genome and presence of internal deletions) with cloning and sequencing of the resulting defective RNAs (example 1).

The following documents have been cited in the International Search Report (ISR) and have been found to be relevant for assessing the novelty and inventiveness of the claimed subject matter :

a) Document Ana Mendez et al., Advances in Experimental Medicine and Biology 1995, Vol. 380, pages 583-589 (**D1**) discloses the production by serial undiluted passages of the PUR46 strain (PUR46-MAD, PUR46mar1CC12) of TEGV in swine testis (ST) cells of three defective RNA viral genomes, namely DI-A (24 kb), DI-B (10.5 kb) and DI-C (9.5 kb) similar to the three ones disclosed in the present application (example 1 refers to DI-A 22 kb, DI-B 10.6kb and DI-C 9.7 kb). The document further characterizes these defective viral genomes (pages 587-588 and Figure 3) which clearly anticipate the subject matter of **claims 1 to 6**. Thus, the subject matter of said claims does not fulfil the requirements of Article 33 (2) and (3) PCT.

b) Document C-L. Liao et al., Virology 1995, Vol. 208 pages 319-327 (**D2**) refers to

different defective-interfering (DI) RNA of mouse hepatitis virus (MHV) (coronavirus) which can replicate in the presence of parental MHV and which retain both the 5' and 3' termini and scattered portions of the internal sequences of the wild-type genome (page 320, left column). Thus, at least the subject matter of **claims 1, 3 and 6** is also anticipated by these references (Article 33 (2) and (3) PCT).

D2 further refers to the use of such MHV DI particles as vector systems for expressing different (viral and nonviral) gene products ("immune modifiers"). **D2** is exemplified by using a DI vector (derived from DIssE RNA) for expressing the (normal and mutant) viral hemagglutinin-esterase (HE). The IPEA considers that the reference to general gene products (see page 326, first paragraph, left column) embraces also products which can be seen as "antigens capable of inducing systemic and secretory immune responses" and thus, the subject matter of **claims 7, 11 and 14-16** does not fulfil the requirements of Article 33 (2) and (3) PCT.

Furthermore, in view of the general known prior art, the IPEA considers that the substitution of said heterologous gene products by antibodies (which confer protection against an infectious agent) and/or the presence of different antigens/antibodies does not require any specific inventive contribution from the person skilled in the art. Thus, the subject matter of **claims 8-10, 12-13 and 17-22**, concerned with different expression vectors and recombinant systems based thereof, does not fulfil the requirements of Article 33 (3) PCT.

c) Document R.G. Van der Most et al., J. Virol. 1991, Vol. 65 (6), pages 3219-3226 (**D3**) discloses the production of MHV DI RNAs by undiluted virus passage. The document characterizes two RNA species, DI-a (5.5 kb) and DI-b (6.5 kb), which anticipates the subject matter of **claims 1, 3 and 6** (Article 33 (2) and (3) PCT). This document also refers to the use of said DI RNAs as general RNA vectors (page 3224, left column) but without any further reference to the expression of any particular gene product. However, several references to DIssE are found in **D3** (page 3219, right column; page 3224, left column and page 3225, left column) and the skilled person would have thought in using the DI RNA vectors of **D3** in the same manner as the ones disclosed in **D2** (derived from DIssE). Thus, in view of the combined teachings of **D2** and **D3**, the subject matter of **claims 7, 11 and 14-16** does not fulfil the requirements of Article 33 (3) PCT

d) Document WO-A-91/03552 (**D4**) discloses "defective (influenza) viral genomes" having the viral replicase recognition signals located on ends 3' (26 terminal nucleotides) and 5' (22 terminal nucleotides), further comprising internal deletions (either (**a**) the complete viral genome and thus resulting in a so-called "RNA template" and/or (**b**) part thereof, i.e. replacement of a viral gene or viral gene segment and resulting in a "defective viral genome"), and wherein said "defective viral genome" depends on a helper virus for its replication and encapsidation. **D4** also refers to the use of said "defective viral genomes" for expressing heterologous genes and in particular for constructing vaccine formulations (page 43). Thus, in view of this disclosure, the IPEA considers that the general subject matter of **claims 1-2, 6-7, 9, 11, 14-17 and 20-24** does not fulfil the requirements of Articles 33 (2) and (3) PCT.

Furthermore, in view of the general known prior art and in agreement with the arguments given in paragraph (**b**) above, the IPEA also considers that the presence of different antigens/antibodies (multivaccines) does not require any specific inventive contribution from the person skilled in the art. Thus, the subject matter of **claims 8, 10, 12-13, 18-19, 25-26 and 39-41** does not fulfil the requirements of Article 33 (3) PCT.

D4 is concerned with recombinant negative strand RNA virus and particularly exemplified with an influenza virus. However, the teachings of **D4** are intended to be general (page 25, lines 23-31). In view that coronaviruses are enveloped viruses containing a single-stranded infectious RNA genome, the IPEA considers that once the use of coronavirus DI particles as vector systems for expressing heterologous gene products was known from **D2** (also **D3** and bearing in mind **D1**), the skilled person would have thought in using such DI particles in agreement with the teachings of **D4**, i.e. construction of vaccines. Thus, the IPEA fails to see any inventive contribution for the general subject matter of **claims 3-5, 27-39, 42 and 44-45** which does not fulfil the requirements of Article 33 (3) PCT.

No relevant prior art has been cited for the subject mater of **claim 43** and thus, the IPEA considers that the specific neutralizing antibodies 6A.C3 are novel and that the prior art would not have led the skilled person to such antibodies in an obvious manner (Articles 33 (2) and (3) PCT).

3) The IPEA raises the following objections concerning the clarity and the scope of the

claims :

a) in view of the important (structural and functional) differences among the different types of viruses (DNA, RNA, positive- and negative-strand DNA/RNA viruses, plant, bacterial viruses, etc..), the IPEA considers that the broad wording of the claims "defective viral genome" is not **fully** supported by the description (in the sense of Article 6 PCT) and that the description does not disclose the invention in a manner sufficiently clear and **complete** for the invention to be carried out by a person skilled in the art in the **whole range** claimed (Article 5 PCT). The Applicant has only disclosed general "defective **coronaviral** genomes", their use as expression vectors and recombinant systems for producing general **coronaviral** vaccines.

b) In view that "defective coronaviral genomes" were already well known in the prior art (**D1-D3**), that their use as (recombinant) expression vectors had been also disclosed (**D2** and **D3**) and that their use for the production of "coronaviral" vaccines does not involve any inventive contribution (**D1-D3** and in particular **D2** in combination with **D4**), the IPEA considers that no single general inventive concept is present for the specific vaccines directed to (**a**) porcine (claims 27-30 and 42-43), (**b**) canine (claims 31-34) and (**c**) feline (claims 35-38) infectious agents (**Rule 13 PCT**).

c) several claims directed to coronaviral vaccines are said to comprise different pathogen antigens of specific porcine pathogens (claim 30), canine pathogens (claim 34) and/or feline pathogens (claim 38). It is not clear whether such antigens are already known for each and all of the recited specific pathogens (and easily available to the skilled person) or else the wording of said claims is only a "desiratum" without any actual technical meaning.

d) in this respect, the (arbitrary) abbreviation 6A.C3 (claim 43) do not define the subject matter in terms of real technical features (Article 6 PCT in combination with Rule 6.3 PCT). This monoclonal antibody is not characterized by technical features such as amino acid/nucleic acid sequence, deposit number (corresponding hybridoma), etc.. and it is not known whether such antibody would have been easily available to the skilled person so as to allow the person skilled in the art to carry out the invention (Article 5 PCT).

e) The description refers alternatively to "TGEV" and to "VPGT" (see for instance

description of Figure 2 on page 3 and Figure 2, etc..). It is not clear whether both abbreviations are used for the same and identical virus or else there is a technical difference between them.

PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional

SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(51) Clasificación Internaci nal de Patentes 6 :
C12N 15/86, 7/01, A61K 39/225, 39/215, 35/76

A1

(11) Número de publicación internaci nal: WO 97/34008

(43) Fecha de publicación internacional: 18 de Septiembre de 1997 (18.09.97)

(21) Solicitud internacional: PCT/ES97/00059

(22) Fecha de la presentación internacional: 12 de Marzo de 1997 (12.03.97)

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 9600620 14 de Marzo de 1996 (14.03.96) ES

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados salvo US)*: CYANAMID IBERICA, S.A. [ES/ES]; Cristobal Bordiu, 35, E-28003 Madrid (ES).

(72) Inventores; e
(75) Inventores/solicitantes *(sólo US)*: ENJUANES SANCHEZ, Luis [ES/ES]; Calle Camino Nuevo, 113, E-28100 Alcobendas (ES). PLANA DURAN, Juan [ES/ES]; Carretera Camprodón, "La Riba", E-17813 Vall De Bianya, Olot (ES). ALONSO VILLANUEVA, Sara [ES/ES]; Autónomo, 62, 3°, E-48012 Bilbao (ES). BALLESTEROS JARREÑO, Mª Luisa [ES/ES]; Calle Sánchez Vera, 7, 3° B, E-16002 Cuenca (ES). CASTILLA CASTRILLON, Joaquin [ES/ES]; Marqués de la Valdavia, 94, Escalera 2, 4° A, E-28100 Alcobendas (ES). GONZALEZ MARTINEZ, José Manuel [ES/ES]; Vicente Medina, 28, Miranda, E-30319 Cartagena (ES). IZETA PARMESAN, Ander [ES/ES]; Pº de los Arbustos, 18, 5°, E-20009 San Sebastian (ES). MENDEZ ZUNZUNEGUI, Ana [ES/ES]; Gran Vía, 170, E-36210 Vigo (ES). MUNTION SAENZ, María [ES/ES]; Avenida Pamplona, 25, 6° B, E-31010 Pamplona (ES). PENZES, Zoltan [HU/ES]; Isla de Ons, 6, 4°, E-28035 Madrid (ES). SANCHEZ MORGADO, José Manuel [ES/ES]; Avenida Portugal, 62, 3°, E-28933 Mostoles (ES). SANCHEZ SANCHEZ, Carlos Miguel [ES/ES]; Calle Villajoyosa, 94, Bajo F, E-28041 Madrid (ES). SMERDOU PICAZO, Cristian [ES/ES]; Avenida Brasilia, 37, E-28028 Madrid (ES). SOLA GURPEGUI, Isabel [ES/ES]; Carretera Estrella, 61, E-31570 San Adrian (ES).

(74) Mandatario: GOMEZ-ACEBO Y DUQUE DE ESTRADA, Ignacio; Jorge Juan, 19, 3° derecha, E-28001 Madrid (ES).

(81) Estados designados: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, Patente ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada
Con informe de búsqueda internacional.
Antes de la expiración del plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente si se reciben tales modificaciones.

(54) Title: VECTORS BASED ON RECOMBINANT DEFECTIVE VIRAL GENOMES, AND THEIR USE IN THE FORMULATION OF VACCINES

(54) Título: VECTORES BASADOS EN GENOMAS VIRALES DEFECTIVOS RECOMBINANTES Y SU EMPLEO EN LA FORMULACION DE VACUNAS

(57) Abstract

The vectors comprise a recombinant defective viral genome which expresses at least one antigen appropriate for inducing secretory and systemic immune responses or an antibody which provides protection against an infectious agent. The viral defective genome comprises the genome of a parental virus which has the signs of recognition of the viral replicase which are located at the extremities 3' and 5', and comprises additionally internal deletions, and wherein said defective viral genome depends on a complementing virus for its replication and encapsidation. Said vectors are appropriate to form a recombinant system which comprises said expression vector and a complementing virus. The system is appropriate for the preparation of mono- and polyvalent vaccines against infectious agents of various animal species, specially pigs, dogs and cats, and as vehicles for the expression of protection antibodies against infectious agents.

(57) Resumen

Los vectores comprenden un genoma viral defectivo recombinante que expresa al menos un antígeno adecuado para la inducción de respuestas inmunes sistémicas y secretoras o un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso. El genoma viral defectivo comprende el genoma de un virus parental que tiene las señales de reconocimiento de la replicasa viral localizadas en los extremos 3' y 5', que comprende además deleciones internas, y en donde dicho genoma viral defectivo depende de un virus complementador para su replicación y encapsidación. Estos vectores son adecuados para formar un sistema recombinante que comprende dicho vector de expresión, y un virus complementador. El sistema es adecuado para la elaboración de vacunas mono- y polivalentes frente agentes infecciosos de distintas especies animales, especialmente cerdos, perros y gatos, y como vehículos para la expresión de anticuerpos protectores frente a agentes infecciosos.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AM	Armenia	**GB**	Reino Unido	**MW**	Malawi
AT	Austria	**GE**	Georgia	**MX**	México
AU	Australia	**GN**	Guinea	**NE**	Níger
BB	Barbados	**GR**	Grecia	**NL**	Paises Bajos
BE	Bélgica	**HU**	Hungria	**NO**	Noruega
BF	Burkina Faso	**IE**	Irlanda	**NZ**	Nueva Zelandia
BG	Bulgaria	**IT**	Italia	**PL**	Polonia
BJ	Benin	**JP**	Japón	**PT**	Portugal
BR	Brasil	**KE**	Kenya	**RO**	Rumania
BY	Belarús	**KG**	Kirguistán	**RU**	Federación Rusa
CA	Canadá	**KP**	República Popular Democrática de Corea	**SD**	Sudán
CF	República Centroafricana			**SE**	Suecia
CG	Congo	**KR**	República de Corea	**SG**	Singapur
CH	Suiza	**KZ**	Kazajstán	**SI**	Eslovenia
CI	Côte d'Ivoire	**LI**	Liechtenstein	**SK**	Eslovaquia
CM	Camerún	**LK**	Sri Lanka	**SN**	Senegal
CN	China	**LR**	Liberia	**SZ**	Swazilandia
CS	Checoslovaquia	**LT**	Lituania	**TD**	Chad
CZ	República Checa	**LU**	Luxemburgo	**TG**	Togo
DE	Alemania	**LV**	Letonia	**TJ**	Tayikistán
DK	Dinamarca	**MC**	Mónaco	**TT**	Trinidad y Tabago
EE	Estonia	**MD**	República de Moldova	**UA**	Ucrania
ES	España	**MG**	Madagascar	**UG**	Uganda
FI	Finlandia	**ML**	Mali	**US**	Estados Unidos de América
FR	Francia	**MN**	Mongolia	**UZ**	Uzbekistán
GA	Gabón	**MR**	Mauritania	**VN**	Viet Nam

VECTORES BASADOS EN GENOMAS VIRALES DEFECTIVOS RECOMBINANTES Y SU EMPLEO EN LA FORMULACION DE VACUNAS

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a unos vectores basados en genomas virales defectivos recombinantes que expresan antígenos adecuados para la inducción de respuestas inmunes sistémicas y secretoras para la prevención de infecciones en mucosas y a su empleo con fines vacunales junto con un virus complementador adecuado.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La obtención de proteínas recombinantes utilizando vectores de expresión es un hecho conocido desde hace tiempo. En general, los sistemas de expresión procarióticos y de levaduras son altamente eficaces y fáciles de usar mientras que los sistemas de expresión que se utilizan con células eucarióticas superiores plantean algunos inconvenientes relacionados con bajos niveles de producción de proteínas y con limitaciones en el rango del hospedador. De los sistemas de expresión existentes para células eucarióticas superiores, los vectores a base de baculovirus son los más eficaces en términos de producción de proteína. Sin embargo, sólo se pueden utilizar en células de insecto que, como es conocido, glicosilan las proteínas de manera diferente a como lo hacen las células animales. Adicionalmente, la construcción del virus recombinante sucede a través de una recombinación homóloga, lo cual es una técnica laboriosa especialmente cuando se tienen que analizar numerosas variantes genéticas.

Por otra parte, se conocen vectores basados en virus ADN adecuados para expresar genes heterólogos. No obstante, el empleo de vectores basados en ADN presenta numerosos inconvenientes, puesto que se replican en el núcleo de la célula huésped y pueden llegar a integrarse en dicho genoma, por lo que son poco seguros. Por el contrario, los vectores

basados en ARN superan los inconvenientes asociados con el empleo de virus ADN ya que no se replican en el genoma de la célula huésped sino en el citoplasma, la replicación transcurre vía ARN y no vía ADN, y las posibilidades de que se integren en el genoma son muy pequeñas, por lo que los vectores basados en estos virus ARN son más seguros.

Adicionalmente, se conocen partículas defectivas interferentes (DI), que contienen la cápsida del virión y un genoma defectivo, que son unos mutantes subgenómicos de deleción generados mayoritariamente a partir de genomas virales infectivos por un error de replicación. En general, el término "partícula DI" se refiere a virus defectivos que carecen de una región del genoma ARN o ADN, contienen las proteínas y antígenos del virus, requieren la coinfección del virus parental infectivo para replicarse (virus complementador) e interfieren específicamente con el virus complementador homólogo al replicarse a sus expensas [Huang y Baltimore, Nature, **226**, 325-327 (1970)]. Los genomas DI surgen por reordenamientos del genoma como resultado de "saltos" de la ARN polimerasa de un ARN molde a otro o de un segmento de un ARN molde a otro segmento del mismo. Estos genomas DI, una vez generados, se amplifican a expensas del genoma parental o del virus amplificador que codifica las proteínas implicadas en la replicación y encapsidación y que debe competir con los genomas defectivos por tales productos.

Se han obtenido y caracterizado partículas DI de algunos coronavirus tales como el virus de la hepatitis murina (MHV), el virus de la bronquitis infecciosa (IBV) y el coronavirus bovino (BCV), aunque no se han descrito partículas DI derivadas del virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT). Una de las partículas DI naturales del MHV se ha utilizado como base para desarrollar un vector de expresión en el que el gen exógeno se inserta bajo el control de una secuencia promotora interna de transcripción [Lin and Lai, J. Virol., 6110-6118, Oct. (1993)].

En general, los vectores conocidos de expresión de genes heterólogos basados en partículas DI presentan una serie de inconvenientes relacionados con su especificidad de especie y órgano diana y con su limitada capacidad de clonaje, lo que restringe las posibilidades de uso de estos vectores tanto en investigación básica como en investigación aplicada a fines terapéuticos, incluyendo los fines vacunales.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de disponer de vectores de expresión de genes heterólogos que superen los inconvenientes mencionados. En particular, sería muy adecuado disponer de unos vectores de expresión de genes heterólogos que tuvieran una elevada seguridad y capacidad de clonaje y pudieran ser diseñados de forma que se pudiera controlar fácilmente su especificidad de especie y su tropismo.

La presente invención proporciona una solución al problema existente que comprende un vector basado en un genoma viral defectivo recombinante que expresa antígenos adecuados para inducir una respuesta inmune y para prevenir infecciones causadas por diversos agentes infecciosos de distintas especies animales. Los vectores de expresión de genes (o secuencias de ADN) heterólogos proporcionados por esta invención tienen una elevada seguridad así como una elevada capacidad de clonaje y pueden ser diseñados de forma que se puede controlar fácilmente su especificidad de especie y su tropismo, por lo que dichos vectores son adecuados para la formulación de vacunas capaces de conferir protección contra infecciones causadas por distintos agentes infecciosos de distintas especies animales.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención lo constituye un vector basado en un genoma viral defectivo recombinante, que expresa al menos un antígeno adecuado para la inducción de una respuesta inmune, en particular, una respuesta inmune sistémica y secretora, frente a agentes infecciosos de distintas especies animales, o un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso,

provisto de elevada seguridad y capacidad de clonaje y que puede ser diseñado de forma que se puede controlar fácilmente su especificidad de especie y su tropismo.

El genoma viral defectivo que sirve de base para la construcción de dicho vector también constituye un objeto adicional de esta invención.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un sistema recombinante de expresión de proteínas heterólogas que comprende (a) el vector previamente descrito y (b) un virus complementador que facilita las proteínas implicadas en la replicación y encapsidación del genoma viral defectivo recombinante.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituyen unas vacunas capaces de inducir protección frente a infecciones causadas por distintos agentes infecciosos de distintas especies animales que comprende el sistema recombinante previamente descrito junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Estas vacunas pueden ser mono-, o multivalentes dependiendo de si los vectores de expresión presentes en el sistema recombinante expresan uno, o más antígenos capaces de inducir una respuesta inmune frente a uno, o mas agentes infecciosos o uno o más anticuerpos que proporcionan protección contra uno o más agentes infecciosos.

Otros objetos proporcionados por esta invención comprenden un método de inmunización de animales que consiste en la administración de dicho sistema recombinante o vacuna, así como un método para proteger a los animales recién nacidos contra agentes infecciosos que infectan a dichas especies.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la estructura del VGPT. El virión es una partícula esférica formada por una envuelta lipídica en cuyo interior se encuentra una molécula de ARN de 28,5 kilobases (kb) de cadena sencilla y polaridad positiva. Este

ARN está asociado a la proteína N formando la nucleocápsida. Las proteínas estructurales M y sM se encuentran incluídas en la membrana. La proteína S se agrupa en trímeros y está anclada en la parte externa de la envuelta formando los peplómeros.

La Figura 2 muestra la organización genómica de los cuatro coronavirus secuenciados: MHV, IBV, HCV229E (coronavirus humano 229E) y VGPT. Las fases abiertas de lectura que codifican cada proteína se representan a escala. En cada genoma se indica con flechas el principio de los ARNm que expresa cada virus. El número de ARNm expresados por los virus MHV o VGPT puede variar dependiendo de la cepa viral. En este esquema las flechas del VGPT se corresponden con los ARNm que expresa la cepa THER-1. Los ARNm son 3'-coterminales y se numeran siguiendo un orden decreciente de tamaño.

La Figura 3 muestra la expresión del genoma del VGPT, cepa THER-1. Se indica la disposición de las fases de lectura abierta (ORF) en el genoma: Pol, polimerasa; S, sM, M y N, proteínas estructurales; nsp 3a, 3b y 7, proteínas no estructurales (la proteína 3b no se produce con este virus). El genoma se transcribe en un ARN de igual longitud pero polaridad negativa (-) que servirá de molde para la síntesis de los 7 ARNm (1 a 7). En cada ARNm se representa la secuencia común, líder, del extremo 5' (cuadrado), el tramo de poliadenina en el extremo 3' y la zona que se traduce en cada uno de ellos (líneas gruesas).

La Figura 4 muestra la evolución del título de los aislados del VGPT THER-1 (A) y PUR46-*mar* 1CC12 (B) con el número de pase a alta multiplicidad de infección (m.d.i.) en células ST.

La Figura 5 muestra los resultados del análisis electroforético de los ARNs producidos en células ST infectadas con virus THER-1 pasado 46 veces a alta m.d.i. El número de pase se indica encima de cada canal mientras que las barras a la izquierda indican la posición de los

marcadores de peso molecular (el ARN genómico del VGPT y marcadores GibcoBRL), expresados en kb. Las barras a la derecha indican los ARNm del VGPT y los ARNs defectivos interferentes (DI). NI, no infectado.

La Figura 6 muestra los resultados del análisis en ensayos tipo Northern del ARN de células ST infectadas con el virus THER-1p35.

La Figura 7 muestra los resultados de ensayos tipo Northern del ARN procedente de pases diluídos del virus THER-1-STp41 en células ST.

La Figura 8 muestra el efecto del cambio de línea celular en la propagación de los ARNs defectivos A, B y C. El virus THER-1-STp46 se pasó diez veces sin diluir en células IPEC (epitelio intestinal de cerdo), y cinco en células PM (macrófagos porcinos). Figuras 8A y 8B, evolución del título viral con el número de pase en células IPEC y PM, respectivamente. Figura 8C, análisis del ARN de células ST infectadas con virus procedente de los pases 1 y 10 en IPEC (por marcado metabólico con $^{32}P_i$), o de los pases 1 y 5 en PM (por hibridación con un oligonucleótido complementario al ARN líder).

La Figura 9 muestra la encapsidación de los genomas defectivos A, B y C. La Figura 9A muestra un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, en el que se analiza el ARN extraído de viriones purificados, por medio de centrifugación a través de un colchón de sacarosa del 15% (p/v), del pase 1 y del pase 41. En el canal del pase 41 se observan los ARNs A, B y C, ademas del genoma parental. Las barras de la izquierda indican marcadores de movilidad en kb. La Figura 9B muestra los resultados del análisis del ARN de viriones del pase 41 purificados por centrifugación a través de colchones o de un gradiente continuo de sacarosa, en ensayos tipo Northern con un oligonucleótido complementario al ARN líder. Como marcadores se utilizaron los ARNs comerciales de GibcoBRL y ARN de viriones del pase 1 (canal a). Canales b y

c, ARN extraído de viriones sedimentados a través de colchones de sacarosa del 31% y 15% (p/v), respectivamente. Canales d y e, ARN extraído de virus purificado a través de un colchón continuo de sacarosa, fracciones de densidad 1,20 y 1,15 g/ml, respectivamente.

La Figura 10 muestra la estrategia de clonaje de los ARNs defectivos DI-B y DI-C, donde se observa una representación esquemática de los fragmentos de ADN complementario (ADNc) obtenidos por RT-PCR utilizando como molde ARN genómico de longitud total (A), DI-B (B) y DI-C (C). Las líneas discontinuas indican la ausencia del fragmento previsto debido a su gran tamaño. Los ARNs defectivos se clonaron en cuatro fragmentos solapantes (*a*, *b*, *c* y *d*), representados por líneas; los números debajo de estas líneas indican el tamaño del fragmento determinado en geles de agarosa. Los oligonucleótidos utilizados como iniciadores y su polaridad se indican mediante flechas y números. La secuencia de los oligonucleótidos se indica en la Tabla 2. Las cajas rayadas o abiertas en (A) indican la posición relativa de los genes virales: pol, polimerasa; S, M y N, genes estructurales; 3a, 3b, sM y 7, ORFs pequeñas. Los cuadrados negros más estrechos indican la secuencia líder.

La Figura 11 muestra los resultados del análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos en la amplificación de los ARN defectivos. El ARN de viriones purificados THER-1p1 o THER-1p41 se utilizó como molde en una reacción de RT-PCR con los oligonucleótidos 1 y 2 (*a*), 3 y 4 (*b*), 5 y 6 (*c*) o 7 y 8 (*d*), cuya secuencia y posición en el genoma parental se indica en la Tabla 2. En cada caso se indica el canal correspondiente al ARN molde del pase 1 (ARN genómico parental) o del pase 41 (ARN genómico parental, DI-A, DI-B y DI-C), y el canal de marcadores de movilidad de DNA (M, GibcoBRL). Los números en negrita indican el tamaño en kb de los productos de amplificación específicos de los ARNs defectivos. ARNs B+C, ARNs B y C purificados de banda en un

experimento de fraccionamiento por gel de los ARNs del virus THER-1-STp41. Los ARNs B y C migran muy próximos, y se cortaron como una banda única.

La Figura 12 muestra la secuencia completa del ADNc del ARN DI-C [véase la SEC. ID. N° 24], obtenida por secuenciación de los fragmentos solapantes de clonaje *a, b, c* y *d*. El ARN DI-C ha mantenido cuatro regiones discontinuas del genoma parental: I, II, III y IV. Los puntos de unión de estas regiones se indican en la secuencia mediante flechas. Se indica la traducción de las tres ORFs presentes en el genoma DI-C: la ORF de 6,7 kb quimérica que resulta de la fusión de las regiones discontinuas I y II en fase; la mini-ORF de tres aminoácidos que la precede en fase y la ORF que comienza en el AUG del gen S. Se han sombreado las regiones de alta homología con los dominios proteicos descritos en otros coronavirus como responsables de las funciones polimerasa, helicasa y sitio de unión a metales. Las secuencias promotoras de transcripción CTAAAC se indican sombreadas. La zona de solapamiento entre las ORFs 1a y 1b (41 nucleótidos) se presenta sombreada, y se indica la secuencia "de deslizamiento" del ribosoma subrayada, y el codón de terminación de la ORF1a encuadrado. En las posiciones 637, 6397 y 6485 se indican los cambios puntuales respecto al genoma parental. Se indican los nucleótidos presentes en el genoma parental en estas posiciones.

La Figura 13 muestra un diagrama de la estructura del ARN DI-C. La longitud genómica total se muestra a la derecha de los recuadros. El ARN DI-C contiene cuatro regiones discontinuas (I, II, III y IV) del genoma del VGPT. Estas regiones comprenden 2,1 kb del extremo 5' del genoma, la ORF1b casi completa incluyendo la zona de solapamiento entre las ORFs 1a y 1b, el principio del gen S, la ORF7 incompleta y la región 3' no traducida. Las letras y los números sobre el recuadro del genoma parental indican los genes virales. Los números debajo del recuadro indican la posición en el

genoma parental de los nucleótidos flanqueantes de las regiones discontinuas, tomando como referencia la secuencia del aislado VGPT PUR46-PAR. En el recuadro correspondiente al ARN DI-C, la longitud de las cuatro regiones discontinuas se indica en nucleótidos. En el tercer recuadro se indica el número de nucleótidos derivado de cada gen viral, teniendo en cuenta que las ORFs 1a y 1b se solapan 43 nucleótidos en el genoma parental. Las fases abiertas de lectura que predice el análisis por ordenador se indican por flechas o cabezas de flecha. Pnt, falso lazo (*pseudoknot*); Pol, polimerasa; Mib, dominio de unión a metales (*metal ion binding*); Hel, helicasa; Cd, dominio coservado (*conserved domain*).

La Figura 14 muestra la estructura del ARN DI-B. El ARN DI-B contiene tres regiones discontinuas (I, II y III) del genoma del VGPT que comprenden 2,1 kb del extremo 5' del genoma, la ORF1b completa incluyendo la zona de solapamiento entre las ORFs 1a y 1b, el principio del gen S, el final de la ORF7 y la región no traducida del extremo 3'. Las letras y los números sobre el recuadro del genoma parental indican los genes virales. Los números debajo del recuadro indican la posición en el genoma parental de los nucleótidos flanqueantes de las regiones discontinuas, tomando como referencia la secuencia del aislado VGPT PUR46-PAR. La heterogeneidad en el tamaño de la deleción ocurrida entre las regiones discontinuas II y III hace que en realidad exista una población de genomas DI-B. En el segundo y tercer recuadro se indica la longitud en nucleótidos de las tres regiones discontinuas para los genomas de mayor y menor tamaño, respectivamente. En el tercer recuadro se indica el número de nucleótidos derivado de cada gen viral, teniendo en cuenta que las ORFs 1a y 1b se solapan 43 nucleótidos en el genoma parental. Las fases abiertas de lectura que predice el análisis por ordenador se indican por flechas o cabezas de flecha. Pnt, falso lazo (*pseudoknot*); Pol, polimerasa; Mib, dominio de unión a metales (*metal ion binding*); Hel,

helicasa; Cd, dominio coservado (*conserved domain*).

La Figura 15 muestra la estructura secundaria y terciaria del ARN en la zona de solapamiento entre las ORFs 1a y 1b en el ARN DI-C. (A) Estructura que se predice al considerar la región más cercana a la estructura de horquilla que presenta complementariedad con los nucleótidos del lazo para constituir el *pseudoknot* (nucleótidos 2354 a 2358). La secuencia "de deslizamiento" UUUAAAC está subrayada. El codón de terminación de la ORF1a se indica encuadrado. (B) Representación esquemática de este *pseudoknot*, que implica dos tramos de complementariedad de secuencias (*stems*: S1 y S2). La secuencia de deslizamiento se representa encuadrada. (C) Un modelo alternativo considerando la secuencia del nucleótido 2489 al 2493 en el plegamiento del *pseudoknot*. Esta estructura contiene un tramo de complementariedad de secuencia (*stem*) adicional. D) Representación esquemática del *pseudoknot*, en la que se señalan los tres *stems*: S1, S2 y S3.

La Figura 16 muestra el mapeo de los ARNs DI por hibridación con oligonucleótidos específicos para el virus en ensayos tipo Northern. El ARN del virus THER-1-STp41 se fraccionó en geles de agarosa hasta conseguir una separación clara de los ARNs del genoma parental y DI A, B y C. El ARN se transfirió a filtros de nailon que se hibridaron con varios oligonucleótidos marcados con $^{32}P_i$, que hibridaron con el genoma parental (+), e hibridaron (+) o no (-) con los genomas defectivos. La localización aproximada de las secuencias complementarias a los oligonucleótidos en el genoma parental se indica con flechas. Su secuencia y posición exactas se indican en la Tabla 3. Todos los oligonucleótidos hibridaron con el genoma parental y dieron los resultados esperados con los ARNs B y C.

La Figura 17 muestra un esquema de obtención de virus vacunales por transfección de células infectadas con ARN DI-C. Se ilustra un esquema prototipo de la construcción que permitió la obtención de ARN DI-C por transcripción *in vitro*,

manteniendo los extremos 5' y 3' presentes en la partícula defectiva original. La secuencia del promotor del bacteriófago T7 [PrT7] y la secuencia del ribozima autocatalítico del virus de la hepatitis delta (HDV) [Rz HDV] se clonaron flanqueando la secuencia del ARN DI-C. Sobre la secuencia se señala el punto de corte autocatalítico introducido por la ribozima. Las puntas de flecha indican las posiciones de las secuencias promotoras de transcripción interna mantenidas de forma natural en el ARN DI-C. L, líder. T7ϕ, señales de terminación de transcripción del bacteriófago T7. Se rescataron viriones que encapsidaron tanto el virus complementador como los genomas defectivos en los que se habían clonado los genes heterólogos, al transfectar los ARNs transcritos *in vitro* sobre células ST infectadas con el virus complementador correspondiente.

La Figura 18 muestra un esquema prototipo de la construcción que permitió la obtención de pDIA-6A.C3 por transcripción *in vitro*, manteniendo los extremos 3' y 5' presentes en la partícula defectiva original. La secuencia del promotor del bacteriófago T7 [T7Pr] y la presencia del ribozima autocatalítico del virus de la hepatitis delta (HDV) [Rz HDV] se clonaron flanqueando la secuencia del ADNc que codifica un ARN autoreplicativo. El plásmido pDIA-6A.C3 contiene el gen que codifica el anticuerpo monoclonal 6A.C3 que neutraliza el VGPT [véase el Ejemplo 4]. El clonaje del gen heterólogo se hizo después de la ORF1b, siguiendo el codon iniciador (AUG) del gen S, y en fase de lectura con este gen [IGS: secuencia intergénica; L: secuencia líder; D: región D (diversity region); J: Región J (joining region); VH: Módulo variable de la cadena pesada de inmunoglobulina; CH: Módulo constante de la cadena pesada de inmunoglobulina; VK: Módulo variable de la cadena ligera de inmunoglobulina; CK: Módulo constante de la cadena ligera de inmunoglobulina; poliA: secuencia poliA; T7ϕ: terminador de la transcripción de T7].

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Esta invención proporciona vectores de expresión de ADNs heterólogos, basados en genomas virales defectivos recombinantes que expresan, al menos, un antígeno adecuado para la inducción de una respuesta inmune frente a distintos agentes infecciosos de distintas especies animales, o un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso, provistos de elevada seguridad y capacidad de clonaje y que pueden ser diseñados de forma que se puede controlar fácilmente su especificidad de especie y su tropismo.

El término "agente infeccioso" en el sentido utilizado en esta descripción incluye a cualquier agente infectivo viral, bacteriano o parasitario que puede infectar a un animal y ocasionarle una patología.

Bajo el término "especie animal" se incluye a animales de cualquier especie, preferentemente mamíferos y más preferentemente de las especies porcina, canina o felina.

En una realización particular de esta invención se proporcionan vectores de expresión basados en genomas virales defectivos recombinantes que expresan al menos un antígeno adecuado para la inducción de una respuesta inmune sistémica y secretora, para la prevención de infecciones en mucosas, diseñados para poder controlar fácilmente la especificidad de especie y su tropismo para infectar mucosas entéricas o respiratorias, por lo que son muy adecuados para inducir inmunidad en mucosas e inmunidad lactogénica, de especial interés en la protección de neonatos frente a infecciones del tracto intestinal. En otra realización particular de esta invención se proporciona un vector de expresión basado en un genoma viral defectivo recombinante que expresa, al menos, un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso.

Los vectores de expresión proporcionados por esta invención comprenden un genoma viral defectivo derivado de un

virus, preferentemente, un virus con genoma ARN y polaridad positiva, que mantiene los extremos 3' y 5' del virus parental, tiene deleciones internas y depende de un virus complementador para su replicación. Por tanto, la invención proporciona, además, un genoma viral defectivo que comprende el genoma de un virus parental que tiene las señales de reconocimiento de la replicasa viral localizadas en los extremos 3' y 5', que comprende además deleciones internas, y en donde dicho genoma viral defectivo depende de un virus complementador que facilita las proteínas funcionales y estructurales para la replicación y encapsidación del genoma viral defectivo recombinante. En una realización particular, el genoma viral defectivo comprende, además, la secuencia completa que codifica la replicasa del virus parental. En este caso, si se desea, el virus complementador puede facilitar sólo las proteínas estructurales necesarias para la encapsidación del genoma viral defectivo recombinante o, alternativamente, las proteínas funcionales y estructurales para la replicación y encapsidación del genoma viral defectivo recombinante. Cuando el virus del que deriva el genoma defectivo es un virus con genoma ARN, el vector de expresión comprende el ADN complementario (ADNc) a dicho ARN defectivo o un ADNc sustancialmente complementario a dicho ARN defectivo.

Los vectores proporcionados por esta invención tienen una elevada capacidad de clonaje, de al menos 18 kb, que es la mayor capacidad de clonaje descrita para un vector basado en virus eucarióticos ARN. Adicionalmente, estos vectores tienen una elevada seguridad puesto que (a) están basados en genomas defectivos, (b) comprenden genomas ARN y no utilizan ADN como intermedio replicativo, y (c) están basados en virus que crecen en el citoplasma de las células infectadas, todo lo cual hace que el genoma defectivo no pueda recombinar con el cromosoma celular.

En una realización particular de esta invención se

describe la obtención de genomas ARN defectivos derivados de coronavirus, particularmente, del VGPT. Estos genomas tienen la ventaja adicional de que la frecuencia de recombinación del VGPT es muy baja ($<1 \times 10^{9}$) lo que hace que el genoma defectivo no recombine con facilidad con el genoma del virus complementador. No obstante, aunque se diese esta recombinación, se obtendría un virus atenuado puesto que la invención contempla la conveniencia de utilizar el mismo virus atenuado tanto como virus complementador como material de partida para la obtención del genoma defectivo.

Los genomas defectivos que constituyen la base de tales vectores pueden obtenerse por pases seriados sin diluir del virus del que derivan, en distintos sistemas celulares. La frecuencia de generación de partículas DI puede variar mucho en distintos sistemas virus-célula, por lo que es conveniente efectuar los pases con distintos aislados del virus en distintas líneas celulares al objeto de seleccionar el aislado y la línea celular adecuados. Al cabo de un cierto número de pases, se aíslan los virus y se utilizan para analizar los ARNs intracelulares producidos en la infección con el fin de observar la posible aparición de bandas que no correspondan a ningún ARN mensajero (ARNm) viral, en cuyo caso, para analizar la naturaleza de esos nuevos ARNs, subgenómicos o defectivos, se continúan los pases seriados sin diluir con el virus parental. Al cabo de unos pases, se analiza la evolución del patrón de ARNs a lo largo de los pases seriados para lo cual se infectan células del sistema celular adecuado con virus procedentes de distintos pases y se analizan los ARNs producidos por técnicas convencionales, por ejemplo, marcaje metabólico con $^{32}P_i$ o hibridación con un oligonucleótido apropiado. En el Ejemplo 1 se describe de forma detallada la obtención y caracterización de unos ARNs defectivos derivados del VGPT.

Con los ARN defectivos se pueden obtener los ADNc correspondientes, complementarios o sustancialmente

complementarios, a dichos ARN defectivos, mediante una reacción de transcriptasa inversa (RT) y amplificación en cadena de la polimerasa (PCR), en adelante RT-PCR. A continuación, los ADNc se pueden clonar en plásmidos adecuados, por ejemplo Bluescript II, bajo el control de promotores eficaces. Los plásmidos resultantes contienen el genoma viral defectivo bajo el control de unos elementos reguladores, que contienen las señales de regulación y control de la replicación así como del inicio y terminación de la transcripción y traducción. Así, estos plásmidos pueden incluir secuencias poliA, secuencias de corte auto-catalítico o de reconocimiento de enzimas de restricción que permiten la inserción del ADN heterólogo, y las señales de regulación, control y terminación correspondientes.

Los plásmidos conteniendo el genoma defectivo, o el ADNc correspondiente, así obtenidos se pueden manipular por técnicas de Ingeniería Genética convencionales para clonar, al menos, una secuencia de ADN heterólogo, que codifica una determinada actividad, bajo el control del promotor de un gen que esté presente en los genomas defectivos u cualquier otro promotor del virus del que deriva el genoma defectivo o variante de estos promotores con eficiencia aumentada, y de las secuencias reguladoras contenidas en el vector de expresión resultante. En el Ejemplo 2 se describe la generación de vectores de expresión que codifican antígenos que inducen protección frente a distintos virus.

Los vectores de expresión proporcionados por esta invención pueden expresar una o más actividades, tales como uno o más antígenos capaces de inducir respuestas inmunes frente a distintos agentes infecciosos, o uno o más anticuerpos que proporcionan protección contra uno o más agentes infecciosos. En una realización particular y preferida, estos vectores expresan, al menos, un antígeno capaz de inducir una respuesta inmune sistémica o una respuesta inmune en mucosas frente a distintos agentes

infecciosos que se propagan en mucosas respiratorias o entéricas. En otra realización particular y preferida, dichos vectores de expresión expresan, al menos, un gen que codifica las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG_1, IgA, etc.) que proporciona protección contra un agente infeccioso. En un caso particular el anticuerpo expresado es el anticuerpo monoclonal identificado como 6A.C3 [véase el Ejemplo 4] que neutraliza el VGPT, expresado con isotipos IgG_1 o IgA en el que la parte constante de la inmunoglobulina es de origen porcino.

En una realización particular de esta invención, el clonaje de los genes heterólogos en un plásmido que contenía un ADNc de un ARN defectivo derivado del VGPT, se hizo después de la ORF1b, siguiendo el codon iniciador (AUG) del gen S, y en fase de lectura con este gen (Ejemplo 2). Alternativamente, las secuencias de ADN heterólogas se pueden clonar en otras zonas del genoma, por ejemplo en las zonas correspondientes a las ORFs 1, 2 ó 7 del VGPT. A partir de los plásmidos resultantes se expresan ARNs utilizando una polimerasa adecuada, con los que se transforman células apropiadas previamente infectadas con un virus colaborador atenuado, con lo que se pueden rescatar viriones conteniendo el genoma del virus complementador y otros con el genoma defectivo (Figura 17).

Alternativamente, los vectores de expresión de esta invención permiten la expresión de uno o varios genes utilizando la misma estrategia arriba descrita. Para ello, se pueden utilizar uno o varios promotores, o bien un promotor y varios sitios de reconocimiento del ribosoma (IRES), o alternativamente varios promotores y un sitio de reconocimiento del ribosoma.

La invención también proporciona un sistema recombinante de expresión de proteínas heterólogas que comprende (a) el vector previamente descrito y (b) un virus complementador que facilita las proteínas implicadas en la replicación y

encapsidación del genoma viral defectivo recombinante. Por tanto, se proporciona un sistema recombinante de expresión de proteínas heterólogas basado en genomas virales defectivos recombinantes que expresan proteínas con al menos una determinada actividad, que comprende:

a) un vector recombinante que contiene un genoma viral defectivo para el que, en su caso, se ha obtenido un ADNc manipulable por Ingeniería Genética convencional que tiene las señales de reconocimiento para la replicasa viral localizadas en los extremos 3' y 5', comprende además unas deleciones internas, y al menos una secuencia de ADN que codifica una actividad, por ejemplo, un antígeno capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas, o un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso; y

b) un virus complementador que proporciona las proteínas funcionales y estructurales para la replicación y encapsidación del genoma defectivo.

Alternativamente, el sistema recombinante de expresión de proteínas heterólogas comprende un vector de expresión, del tipo previamente descrito, que comprende la secuencia completa que codifica la replicasa del virus parental y un virus parental complementador que proporciona las proteínas estructurales para la encapsidación del genoma defectivo y, opcionalmente, las proteínas funcionales (replicasa) para la replicación del genoma viral defectivo.

Estos sistemas permiten la expresión bien de antígenos capaces de inducir una respuesta inmune o bien de anticuerpos que proporcionan protección contra agentes infecciosos, por lo que son adecuados para su empleo con fines vacunales y de protección frente a infecciones.

La invención también proporciona unas vacunas capaces de inducir protección frente a infecciones causadas por distintos agentes infecciosos de distintas especies animales que comprenden (i) el sistema recombinante arriba descrito, constituido por (a) un vector de expresión basado en un

genoma viral defectivo en el que se clona la secuencia de ADN heteróloga y (b) el virus complementador que colabora en la replicación del genoma defectivo, junto con, opcionalmente, (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las vacunas proporcionadas por esta invención son adecuadas, por tanto, para conferir inmunidad contra distintos agentes infecciosos de distintas especies animales.

Por "conferir inmunidad", en el sentido utilizado en esta descripción, debe entenderse la puesta en marcha en el organismo receptor (animal a tratar), por parte del sistema recombinante previamente descrito, de los mecanismos adecuados, tales como células presentadoras de antígenos, linfocitos B y T, anticuerpos, sustancias potenciadoras de la respuesta celular (interleuquinas, interferones, etc.), factores de necrosis celulares y sustancias similares que hacen que el animal quede protegido frente a infecciones causadas por agentes patógenos.

Las vacunas proporcionadas por esta invención pueden ser monovalentes o multivalentes dependiendo de si los vectores de expresión presentes en el sistema recombinante expresan uno o más antígenos capaces de inducir una respuesta inmune frente a uno o más agentes infecciosos. Los vectores de expresión pueden ser monovalentes o polivalentes según expresen uno o más anticuerpos que proporcionan protección contra uno o más agentes infecciosos.

La especificidad de especie se controla de forma que el virus complementador exprese la proteína de la envuelta adecuada para ser reconocida por los receptores celulares de la especie correspondiente. Un grupo particular de vacunas proporcionadas por esta invención comprende como virus complementador un coronavirus, preferentemente, un coronavirus porcino, canino o felino.

Estas vacunas son especialmente adecuadas contra agentes infecciosos porcinos, caninos y felinos, que infecten las mucosas de estas especies o las utilicen como vía de entrada.

En una realización particular de esta invención se proporcionan vacunas monovalentes capaces de proteger cerdos, perros y gatos contra distintos agentes infecciosos porcinos, caninos y felinos, y el tropismo se controla expresando la glicoproteína S de un coronavirus.

Las vacunas monovalentes contra agentes infecciosos porcinos pueden contener un vector de expresión que exprese un antígeno seleccionado del grupo esencialmente constituido por antígenos de los siguientes patógenos porcinos: Actinobacillus pleuropneumoniae, Actinobacillus suis, Haemophilus parasuis, Parvovirus porcino, Leptospira, Escherichia coli, Erysipelotrix rhusiopathiae, Pasterella multocida, Bordetella bronchiseptica, Clostridium sp., Serpulina hydiosenteriae, Mycoplasma hyopneumoniae, virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), coronavirus respiratorio porcino, rotavirus, o contra los patógenos causantes del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, la enfermedad de Aujeszky (Pseudorabies), influenza porcina o gastroenteritis transmisible y el agente etiológico de la rinitis atrófica y de la ileitis proliferativa.

Las vacunas monovalentes contra agentes infecciosos caninos pueden contener un vector de expresión que exprese un antígeno seleccionado del grupo esencialmente constituido por antígenos de los siguientes patógenos caninos: herpesvirus caninos, adenovirus canino tipos 1 y 2, parvovirus canino tipos 1 y 2, reovirus canino, rotavirus canino, coronavirus canino, virus de la parainfluenza canina, virus de la influenza canina, virus del moquillo (Distemper virus), virus de la rabia, retrovirus y calicivirus canino.

Las vacunas monovalentes contra agentes infecciosos felinos pueden contener un vector de expresión que exprese un antígeno seleccionado del grupo esencialmente constituido por antígenos de los siguientes patógenos felinos: calicivirus del gato, virus de la inmuno-deficiencia felina, herpesvirus felinos, virus de la panleucopenia felina, reovirus felino,

rotavirus felino, coronavirus felino, virus de la peritonitis infecciosa del gato, virus de la rabia, Chlamydia psittaci felina, y virus de la leucemia felina.

Los vectores pueden expresar un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso, por ejemplo, un agente infeccioso porcino, canino o felino como los citados previamente. En una realización particular, se han elaborado unos vectores que expresan el anticuerpo monoclonal recombinante identificado como 6A.C3 que neutraliza el VGPT.

Las vacunas proporcionadas por esta invención son capaces de proteger a los lechones mediante la inducción de una inmunidad lactogénica, lo que tiene un especial interés en la protección de neonatos frente a infecciones del tracto intestinal.

En general, las vacunas proporcionadas por la invención pueden contener una cantidad de antígeno capaz de introducir en el animal a inmunizar un título de virus complementador de, al menos, 10^8 unidades formadoras de placa (ufp).

Como excipiente puede utilizarse un diluyente tal como suero salino fisiológico u otras soluciones salinas similares. Asimismo, estas vacunas pueden contener también un adyuvante de los habitualmente utilizados en la formulación de vacunas, tanto acuoso, tal como hidróxido de aluminio, QuilA, suspensiones de geles de alúmina y similares, como oleoso, a base de aceites minerales, glicéridos y derivados de ácido graso, y sus mezclas, por ejemplo, Marcol 52 (ESSO Española S.A.), Simulsol 5100 (SEPIC) y Montanide 888 (SEPIC).

Estas vacunas también pueden contener sustancias potenciadoras de la respuesta celular (PRC), es decir, sustancias potenciadoras de subpoblaciones de células T helper (Th_1 y Th_2) tales como interleuquina-1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, g-IFN (gamma interferón), factor de necrosis celular y sustancias similares, que podrían,

teóricamente, provocar inmunidad celular en los animales vacunados. Estas sustancias PRC podrían utilizarse en formulaciones vacunales con adyuvantes acuosos u oleosos. También pueden utilizarse otro tipo de adyuvantes que modulan e inmunoestimulan la respuesta celular tales como el MDP (muramil dipéptido), ISCOM (Immuno Stimulant Complex) o liposomas.

La invención proporciona vacunas multivalentes capaces de prevenir y proteger animales de distintas infecciones. Estas vacunas multivalentes pueden elaborarse a partir de vectores de expresión en los que se han insertado las distintas secuencias que codifican los antígenos correspondientes en el mismo vector recombinante o bien construyendo vectores recombinantes independientes que posteriormente se mezclarían para su co-inoculación junto con el virus complementador. Por tanto, estas vacunas multivalentes comprenden un sistema recombinante en el que el propio vector de expresión contiene más de una secuencia de ADN que codifica más de un antígeno o alternativamente, el sistema recombinante utilizado en la elaboración de la vacuna puede contener distintos vectores de expresión que expresen cada uno de ellos al menos un antígeno distinto. La limitación existente en este tipo de vacunas multivalentes radica en que dichos vectores expresen antígenos de agentes infecciosos de una misma especie animal y que el virus complementador sea el adecuado para tal especie.

Análogamente, se pueden preparar vacunas multivalentes que comprenden vectores multivalentes utilizando secuencias que codifican anticuerpos que proporcionan protección contra agentes infecciosos en lugar de secuencias que codifican los antígenos. Estos vectores pueden contener un sistema recombinante que comprende bien un vector de expresión que contiene más de una secuencia de ADN que codifica más de un anticuerpo o bien distintos vectores de expresión que expresan, cada uno de ellos, al menos, un anticuerpo

distinto.

En una realización particular de esta invención se proporcionan vacunas capaces de conferir inmunidad a cerdos, perros y gatos contra distintos agentes infecciosos porcinos, caninos y felinos, repectivamente. Para ello, los vectores de expresión contenidos en el sistema recombinante de la vacuna deben expresar distintos antígenos de los patógenos porcinos, caninos o felinos previamente mencionados.

Las vacunas de esta invención pueden presentarse en forma líquida o liofilizada y pueden prepararse suspendiendo los sistemas recombinantes en el excipiente. Si dichos sistemas estuvieran en forma liofilizada, el propio excipiente podría ser el reconstituyente.

Alternativamente, las vacunas proporcionadas por esta invención se pueden utilizar en combinación con otras vacunas convencionales, ya sea formando parte de las mismas o bien como diluyente o fracción liofilizada para diluirse con otras vacunas ya sean convencionales o recombinantes.

Las vacunas proporcionadas por esta invención pueden administrarse al animal por vía oral, nasal, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intramuscular o por medio de aerosol.

La invención también proporciona un método para la inmunización de animales, en particular, cerdos, perros y gatos, contra uno o varios agentes infecciosos de forma simultánea, que comprende la administración por vía oral, nasal, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intramuscular o por medio de aerosol (o formas combinadas de éstas) de una vacuna que contiene una cantidad inmunológicamente eficaz de un sistema recombinante proporcionado por esta invención.

Adicionalmente, la invención también proporciona un método para proteger a los animales recién nacidos contra agentes infecciosos que infectan a dichos animales, que consiste en la administración por vía oral, nasal,

subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intramuscular o por medio de aerosol (o formas combinadas de éstas) a las madres antes de o durante el periodo de gestación, o a su progenie, una vacuna que contiene una cantidad inmunológicamente eficaz de un sistema recombinante proporcionado por esta invención.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos que describen de forma detallada la obtención de genomas virales defectivos, su caracterización, la construcción de plásmidos y su manipulación para obtener los vectores de expresión y la inducción de anticuerpos neutralizantes frente a diferentes agentes infecciosos de ditintas especies.

EJEMPLO 1

GENERACION DE PARTICULAS DEFECTIVAS DERIVADAS DEL VGPT

1.1 Pases seriados a alta m.d.i., sin diluir, de cepas de VGPT

Con la finalidad de promover la generación de partículas defectivas, o la imposición de las ya existentes en pequeña proporción en la población viral, se dieron pases seriados de distintos aislados del VGPT sin diluir en distintos sistemas celulares. Debido a que la frecuencia de generación de partículas DI puede variar mucho en distintos sistemas virus-célula, los pases se llevaron a cabo con distintos aislados del VGPT (THER-1 y PUR46-*mar* 1CC12) en las líneas celulares ST (*swine testis*, células epiteliales de testículo de cerdo).

La cepa THER-1 [Transmisible gastroenteritis coronavirus Helper Entérico y Respiratorio, estirpe 1] es un mutante atenuado por 20 pases en cultivos de células ST derivado de la cepa PUR46-MAD [Sánchez y col., Virology **174**, 410-417 (1990)]. La cepa PUR46-*mar* 1CC12 también se describe en Sánchez y col., [citado *supra*].

Cada cepa de VGPT se pasó sin diluir 35 veces en células ST. La m.d.i. del primer pase en cada uno de los tres casos fue de 100 ufp por célula. El sobrenadante de cada pase se

recogió entre las 20 y las 48 horas post-infección (h.p.i.), cuando se observó un efecto citopático claro, normalmente cuando dicho efecto alcanzaba a más de la mitad de la monocapa celular, y la mitad del volumen de este sobrenadante se utilizó en la infección del pase siguiente. La variación del título viral con el número de pase se representa en la Figura 4. El título viral osciló en un rango de dos unidades logarítmicas a lo largo de los pases seriados de cada virus. En el caso de la cepa THER-1, el título en los pases 30 a 46 fue menor que el de los treinta primeros pases.

Los virus que habían sido pasados 35 veces en células ST se utilizaron para analizar los ARNs intracelulares producidos en la infección. Los ARNs, marcados metabólicamente con $^{32}P_i$ entre las horas 6 y 9 postinfección, se analizaron en un gel de agarosa desnaturalizante [Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, (1982)]. En la infección por el virus THER-1-p35 [virus de la cepa THER-1 pasados 35 veces a alta m.d.i.] se apreciaron tres bandas intensas que no correspondían a ningún ARNm viral, situadas entre las bandas correspondientes al ARN genómico y al mensajero del gen S (Figura 5). Para analizar la naturaleza de estos nuevos ARNs subgenómicos se continuaron los pases seriados sin diluir con la cepa THER-1. Al cabo de 46 pases, se analizó la evolución del patron de ARNs a lo largo de los pases seriados. Para ello, se infectaron células ST con virus procedentes de varios pases y los ARNs producidos, marcados metabólicamente, se analizaron en un gel de agarosa desnaturalizante (Figura 5). Mientras que en los primeros pases solamente se detectaron los ARNs genómico y mensajeros subgenómicos virales, en el pase 30 se detectaron tres nuevos ARNs de 22, 10,6 y 9,7 kb (ARNs A, B y C, que en la Figura 5 aparecen como DI-A, DI-B y DI-C, respectivamente). Estos ARNs subgenómicos se mantuvieron de forma estable a lo largo de los 15 pases siguientes, interfiriendo notablemente con la

replicación del ARN genómico y la síntesis de los ARNm del virus complementador (Figura 5, canales 30 a 45). Estos resultados indican que los tres ARNs generados o amplificados en los pases seriados sin diluir son estables y que al menos uno de ellos es interferente.

1.2 Caracterización de los ARNs subgenómicos

1.2.1 Análisis de los extremos y las regiones internas

Para determinar si los ARNs subgenómicos A, B y C tenían la estructura estándar de los ARNs defectivos de coronavirus, en particular, si conservaban los extremos 5' y 3' del genoma silvestre y su pequeño tamaño era debido a deleciones internas, se hicieron varios ensayos de hibridación con sondas específicas para el virus. Para ello, el ARN de las células infectadas con el virus THER-1-STp35 [virus de la cepa THER-1 pasados 35 veces en células ST] se extrajo y se analizó su hibridación con sondas específicas virales en un ensayo tipo Northern [Maniatis et al., citado *supra*] usando oligonucleótidos complementarios al líder y a la secuencia del extremo 3' viral. En cada caso se llevó como control el ARN de células infectadas con virus THER-1-p1 [virus de la cepa THER-1 pasados 1 vez en células ST] y de células ST sin infectar (NI) (canales 1 y 2 de cada filtro, respectivamente). Los oligonucleótidos utilizados como sonda son complementarios al ARN líder (posiciones 66-91 del extremo 5' del genoma parental); a la región no traducida del extremo 3' (nucleótidos 28524-28543 del extremo 5' del genoma parental) y a los genes estructurales M y N (posiciones 97-116 y 5-24 a partir del AUG iniciador de cada gen, respectivamente). Las barras de la derecha indican las posiciones de los ARNm virales y los ARNs subgenómicos A, B y C.

Como puede apreciarse en la Figura 6, los dos oligonucleótidos hibridaron con todos los ARNm del virus parental, y también detectaron los ARNs A, B y C, lo que

indica que estos ARNs han sufrido deleciones internas y han mantenido los extremos. Como una primera aproximación al estudio de qué secuencias genómicas estaban presentes en estos ARNs, el ARN de células infectadas se hibridó con oligonucleótidos complementarios a los genes de las proteínas estructurales virales S, M y N. Ninguno de ellos hibridó con los ARNs defectivos, sugiriendo que los genes de las proteínas estructurales estaban delecionados. Por tanto, los ARNs subgenómicos A, B y C, son genomas defectivos, mantienen los extremos del virus parental y tienen deleciones internas.

1.2.2. Propagación de los ARNs A, B y C

Para comprobar que los ARNs A, B y C son genomas defectivos, dependientes del virus parental para su propagación en cultivo, se infectaron células ST con el virus THER-1-STp41 [virus de la cepa THER-1 pasados 41 veces en células ST] a distintas m.d.i.: 10, 0,1, 0,01 y 0,001 ufp/célula. El virus resultante de este pase, recogido a las 10 h.p.i., se tituló y se amplificó en un segundo pase en células ST, que a su vez se utilizó para infectar nuevas células y extraer el ARN citoplásmico [Maniatis et al., citado *supra*]. El ARN se analizó en un ensayo tipo Northern con un oligonucleótido complementario al ARN líder. En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos. Las m.d.i. se indican sobre cada canal (10^{-3}, 10^{-2}, 10^{-1} y 10 ufp/célula). Como control negativo se incluyó el ARN procedente de una infección de células ST con el virus THER-1-p1, que no contiene ARN subgenómicos, a una m.d.i. de 10 ufp/célula (primer canal). En el canal correspondiente a la infección del virus THER-1-STp41 a una m.d.i. de 10 ufp/célula, control positivo, se señalan los ARNs genómico (ARNm 1), los ARN defectivos A, B y C [representados como DI-A, DI-B, DI-C] y el correspondiente al gen S (ARNm 2).

Se puede observar que cuando la m.d.i. del primer pase (el "cuello de botella" en este experimento, ya que los pases

siguientes son de amplificación) es de 0,1 ufp/célula o menor, los ARNs A, B y C se pierden, en condiciones en que el ARN genómico y los ARNm del virus se detectan en las proporciones esperadas (Figura 7). Los tres ARNs defectivos se mantienen cuando la m.d.i. es de 10 ufp/célula. Dado que los ARNs A, B y C se encuentran en mayor proporción que el ARN genómico en el virus THER-1-p41 utilizado en la infección, estos resultados indican que la replicación o propagación de estos ARNs requiere que las células sean infectadas por virus defectivo y también por el virus complementador. Los ARNs A, B y C requieren, por tanto, funciones del virus complementador que han de ser aportadas *en trans*. Por consiguiente, los ARNs A, B y C son genomas defectivos, que dependen de un virus complementador para su propagación.

1.2.3 Generación, amplificación, propagación e interferencia *in vitro* de los ARN DI en otra línea celular.

Debido a que la generación, amplificación, propagación e interferencia *in vitro* de los ARN DI es específica de la línea celular se ha estudiado el efecto que podría tener un cambio de línea celular en los ARNs defectivos. Para ello, el virus THER-1-STp46 (el virus THER-1 pasado 46 veces a alta m.d.i. en células ST) se sometió a una nueva serie de pases sin diluir, en células epiteliales de intestino de cerdo (IPEC) y macrófagos porcinos (PM). En la Figura 8 se representa la variación del título con el número de pase a lo largo de 10 pases en IPEC (Figura 8A) y 5 pases en PM (Figura 8B). El rendimiento viral en ambas líneas celulares fue menor que el obtenido en células ST, y se estima que la m.d.i. de cada pase varió entre 20 y 0,2 ufp/célula.

El ARN producido en células ST infectadas con THER-1-STp46-IPECp1 [virus THER-1-STp46 pasado 1 vez en células IPEC] y THER-1-STp46-IPECp10 [virus THER-1-STp46 pasado 10 veces en células IPEC] se marcó con $^{32}P_i$ y se analizó en un gel

de agarosa desnaturalizante (Figura 8C).

El ARN de células ST infectadas con virus THER-1-STp46-PMp1 [virus THER-1-STp46 pasado 1 vez en células PM] y THER-1-STp46-PMp5 [virus THER-1-STp46 pasado 5 veces en células PM] se analizó en un ensayo tipo Northern con un oligonucleótido complementario al ARN líder (Figura 8C).

Los resultados se muestran en la Figura 8C, donde puede apreciarse que los tres ARNs defectivos se mantuvieron en el primer pase en ambas líneas celulares, pero solamente el ARN A persistió a lo largo de, al menos, cinco pases en PM, y de diez pases en IPEC. En ambos casos se señalan las posiciones de los ARNs correspondientes al genoma silvestre (1), ARNs A, B y C (DI-A, DI-B y DI-C respectivamente) y ARNm 2 (proteína S). En el canal correspondiente al ARN del virus THER-1-STp46-PMp5 se indica la posición del ARN genómico, que sólo se observó cuando el tiempo de exposición de la autorradiografía fue diez veces mayor que el de la que se muestra en la Figura 8C.

1.3 Encapsidación de los genomas defectivos

Para estudiar si los ARNs defectivos tienen la capacidad de encapsidarse, se hizo una purificación parcial en paralelo de los virus THER-1-STp1 [virus THER-1 pasado 1 vez en células ST] y THER-1-STp41 [virus THER-1 pasado 41 veces en células ST] mediante centrifugación a través de un colchón de sacarosa del 15% peso/volumen. Se extrajo el ARN de los viriones purificados, y se analizó en un gel de agarosa por tinción con bromuro de etidio (Figura 9A). En los viriones del pase 41 se detectaron los ARNs A, B y C con la misma intensidad que el ARN genómico, lo que indica que los tres ARNs defectivos se encapsidan eficientemente.

Para determinar si los genomas defectivos co-encapsidan con el genoma completo o si por el contrario se encapsidan independientemente, se purificó virus THER-1-STp41 por centrifugación a través de colchones de sacarosa de distintas

densidades, o a través de gradientes continuos de sacarosa. El ARN de los viriones purificados en cada caso se analizó en un ensayo de tipo Northern con un oligonucleótido complementario al ARN líder (Figura 9B). Cuando la centrifugación se hizo a través de un colchón de sacarosa del 31% (p/v) (d=1,19 g/ml), sólo se detectó genoma silvestre en los viriones sedimentados. Sin embargo, cuando se empleó un colchón de sacarosa de menor densidad, 15% (p/v) (d=1,11 g/ml), se detectaron los tres ARNs defectivos además del genoma completo. En un gradiente continuo de sacarosa (15-42%, p/v) se logró el enriquecimiento de viriones defectivos en las fracciones superiores del gradiente (densidad cercana a 1,15 g/ml), y de los viriones estándar en las fracciones inferiores (densidad cercana a 1,20 g/ml) como se observa en la Figura 9B, canales d y e. La banda superior en cada canal corresponde a los genomas silvestre y genoma defectivo A (DI-A), y la banda inferior a los genomas defectivos B y C (DI-B y DI-C). Estos resultados indican que los ARNs A, B y C se encapsidan eficientemente, y que los genomas DI-B y DI-C (10,6 y 9,7 kb) lo hacen independientemente del genoma silvestre, en viriones defectivos que son más ligeros que los viriones estándar.

1.4 Clonaje y secuenciación de los ARN defectivos B y C. Determinación de su estructura primaria.

1.4.1 Síntesis de ADN complementario y amplificación de los ARNs B y C.

El tamaño de los ARNs defectivos B y C se había estimado por su movilidad en los geles de electroforesis, siendo de 10,6 y 9,7 kb respectivamente. Debido a su gran tamaño los ARNs defectivos no pudieron ser amplificados en una sola reacción de transcriptasa inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) utilizando iniciadores complementarios a los extremos del genoma. Para superar esta limitación, los genomas defectivos se amplificaron en cuatro reacciones

independientes, utilizando parejas de iniciadores que diesen lugar a cuatro fragmentos solapantes que cubriesen la longitud total del genoma en cada caso. Estos fragmentos solapantes se designaron *a, b, c* y *d*, ordenados desde el extremo 5' al extremo 3' (Figura 10). Se utilizó como molde el ARN del virus THER-1-STp41, extraído de viriones purificados, que contiene los tres ARNs defectivos A, B y C además del genoma parental. Como control se llevó a cabo en paralelo la amplificación del ARN genómico del virus silvestre THER-1.

La secuencia y posición de los oligonucleótidos utilizados como iniciadores en la reacción de RT-PCR se indica en la Tabla 2.

Tabla 2

Características de los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones RT-PCR

SEC. ID. Nº	Polaridad	ORF Coronavirus	Posición en el ARN DI-C[b]	Sitio de Restricción
1	+	Líder VGPT	15-41	-
2	-	ORF1a FIPV	1874-1887	-
3[a]	+	ORF1a VGPT	1524-1550	*Xba*I
4[a]	-	ORF1b VGPT	4365-4389	*Xba*I
5[a]	+	ORF1b HCV229E	4097-4114	*Eco*RI
6[a]	-	ORF1b VGPT	7633-7652	*Eco*RI
7	+	ORF1b VGPT	7633-7650	-
8[a]	-	3'UTR VGPT	9691-9707	*Spe*I
9	+	ORF1b VGPT	8251-8270	-

[a]: Se ha incluido un sitio de restricción en 5' para facilitar su posterior clonaje.

[b]: La posición del oligonucleótido en la correspondiente ORF es en relación con la secuencia mostrada en la Figura 12.

La amplificación por RT-PCR con los iniciadores 1 y 2, del ARN del virus THER-1-STp41 y del ARN del virus parental THER dio lugar a un producto de PCR mayoritario de 1,9 kb (Figura 11, fragmento *a*). Las bandas minoritarias observadas en esta reacción son debidas a hibridaciones inespecíficas, ya que aparecen en los dos canales. Esta misma reacción de RT-PCR se hizo a partir de un fragmento de agarosa que contenía los ARNs DI-B y DI-C juntos procedentes de una purificación por gel, obteniéndose el mismo resultado. Esto indica que el fragmento *a* es común a todos los ARNs DI, y corresponde a la región de 1,9 kb del extremo 5' del genoma silvestre del VGPT.

La amplificación con los oligonucleótidos 3 y 4 dio lugar a un producto de PCR único de 2,8 kb a partir del ARN del virus THER-1-STp41 (Figura 11, fragmento *b*). No se obtuvo ningún producto de PCR a partir del ARN del virus THER-1 control, ya que el tamaño del producto esperado era de 12 kb. De estos datos se deduce que al menos un genoma defectivo tiene un fragmento *b* de 2,8 kb, y los otros tienen este mismo fragmento o uno mayor que no es detectable en las reacciones de PCR por su gran tamaño.

Los oligonucleótidos 5 y 6, separados 4,6 kb en el genoma parental, dieron lugar a dos productos diferentes de 3,5 y 4,6 kb a partir del ARN del virus THER-1-STp41 (Figura 11, fragmento *c*). El producto de 4,6 kb se obtuvo también a partir del ARN del virus silvestre llevado como control. Estos resultados sugieren que el fragmento *c* en al menos un genoma defectivo (probablemente en el genoma defectivo más abundante, DI-C) contiene una deleción, dando lugar por PCR a un fragmento de 3,5 kb. El fragmento de 4,6 kb se deriva del genoma parental presente en la población de ARNs del virus THER-1-STp41, y de aquellos genomas defectivos que hayan conservado esta región del genoma.

La amplificación por RT-PCR con los iniciadores 7 y 8 del ARN genómico del virus parental no generó ninguna banda

(Figura 11, fragmento *d*), ya que la separación entre estos oligonucleótidos es de 9,5 kb en el genoma completo (Figura 10). En contraste, se observaron dos bandas muy intensas de 1,9 y de 2,1 kb cuando se utilizó como molde el ARN del virus THER-1-STp41. Estas bandas se observan como una banda ancha continua, correspondiente al fragmento *d* (Figura 11), probablemente porque co-migran con un conjunto de bandas minoritarias en el entorno de la banda de 1,9 kb, que dificultan la resolución en los geles. Se ha observado heterogeneidad de tamaños en el fragmento *d* de clonaje (véase más adelante).

1.4.2 Asignación de los productos de amplificación [*a, b, c* y *d*] a los distintos ARNs defectivos.

Con objeto de asignar los fragmentos *d* de tamaño variable entre 1,9 y 2,1 kb a los distintos genomas defectivos, el ARN del virus THER-1-STp41, que se había utilizado como molde, se fraccionó en un gel de agarosa hasta que se logró una separación clara de las bandas correspondientes a los ARNs del genoma silvestre, DI-A, DI-B y DI-C. Las bandas correspondientes a cada uno de estos cuatro ARNs se cortaron independientemente y se usaron como molde en la reacción de amplificación de RT-PCR con los oligonucleótidos 8 y 9. A partir del ARN genómico purificado de banda no se obtuvo ningún producto de PCR. A partir del ARN DI-B se obtuvo un producto de PCR predominante de 1,9 kb, aunque se obtuvieron también DNAs menos abundantes, de tamaño variable próximo a 1,9 kb, que indican una cierta heterogeneidad en esta zona. La amplificación del ARN DI-C dio lugar a un producto de PCR mayoritario de 2,1 kb. Estos resultados permitieron asignar el fragmento de 1,9 kb al ARN defectivo B, y el fragmento de 2,1 kb al ARN DI-C.

Una vez asignados los fragmentos *d*, los fragmentos *c* de 3,5 y 4,6 kb obtenidos con los iniciadores 5 y 6 se asignaron a los ARNs defectivos C y B, respectivamente, ya que la suma

de los fragmentos *a* a *d* resultantes de esta asignación coincidía en cada caso con los tamaños de los ARNs B y C estimados por movilidad.

Una vez determinada la secuencia completa de los genomas B y C, se comprobó la asignación de fragmentos mediante la amplificación de cada ARN purificado de banda, utilizando oligonucleótidos que flanqueaban deleciones específicas. La asignación de fragmentos se confirmó también mediante ensayos tipo Northern usando oligonucleótidos que mapeaban en las regiones de la DI-B que no estaban presentes en la DI-C, y *viceversa*.

1.4.3 Clonaje y secuenciación de los fragmentos solapantes *a, b, c y d.*

Los cuatro fragmentos de ADN solapantes *a* (1,9 kb), *b* (2,8 kb), *c* (3,5 kb) y *d* (2,1 kb) complementarios al ARN C se clonaron en Bluescript SK⁻. Se secuenciaron al menos dos clones procedentes de reacciones de RT-PCR independientes. La secuencia de aquellas posiciones que no coincidían en los distintos clones (posiblemente errores de la polimerasa Taq) se secuenciaron directamente de los productos de PCR correspondientes no clonados. De esta forma se determinó la secuencia consenso del ARN DI-C. Se obtuvo una media de 1 error de la polimerasa Taq cada 1,2 kb copiadas. La secuencia completa del genoma DI-C se indica en la Figura 12.

La secuencia completa del ARN DI-C que se obtuvo de esta forma se comparó con la secuencia de las ORFs 1a y 1b del virus PUR46-PAR, [Eleouet et al., Virology **206**, 817-822 (1995)], y con la secuencia determinada en nuestro laboratorio de las otras ORFs del virus THER-1. En la secuencia del ARN DI-C completo se encontraron 14 diferencias de nucleótido respecto a la secuencia de la cepa PUR46-PAR. Estas posiciones fueron secuenciadas en la cepa THER-1, el virus parental de los genomas defectivos, para definir los cambios puntuales del ARN genómico defectivo DI-C. La

secuencia del ARN DI-C sólo presentó tres diferencias de nucleótido respecto a la secuencia correspondiente del virus parental, y una inserción en la posición 9189, que no afecta a ninguna fase abierta de lectura (Figura 12).

1.4.4 Estructura primaria de los genomas DI-C y DI-B.

Los datos de secuencia indicaron que el genoma DI-C estaba formado por cuatro regiones discontinuas del genoma parental (Figura 13) que comprenden: a) los 2144 nucleótidos del extremo 5' del genoma; b) 4540 nucleótidos que corresponden a la región entre las posiciones 12195-16734 del genoma parental, que incluye la zona solapante entre las fases abiertas de lectura 1a y 1b, y aproximadamente la mitad 5' de la fase abierta de lectura 1b; c) una región de 2531 nucleótidos que corresponde a las posiciones 17843-20372 del genoma silvestre, y que comprende la mitad 3' de la ORF1b y los 8 primeros nucleótidos del gen S, y d) los 493 nucleótidos del extremo 3' viral.

La estructura primaria del genoma DI-B se determinó por secuenciación de los fragmentos de clonaje *a* y *b* (comunes a los del genoma DI-C), *c* (igual al del genoma parental) y *d* (específico del genoma DI-B). El genoma DI-B está formado por tres regiones discontinuas del genoma (Figura 14): a) los 2144 nucleótidos del extremo 5' del genoma, común a todos los clones de DI-B, e idéntica a la región I del ARN DI-C; b) una región variable en tamaño, de 8178-8243 nucleótidos que corresponden a las posiciones 12195-20369 a 20436 del genoma parental, y que incluye la zona de solapamiento entre las dos fases abiertas de lectura del gen 1, la ORF1b completa, y los primeros nucleótidos del gen S y c) los 278 a 303 nucleótidos de la región 3' del genoma.

Los clones que constituyen la población designada como genomas DI-B difieren en el tamaño de la deleción que tuvo lugar entre las regiones II y III, que comienza al principio del gen S (entre los nucleótidos 6 y 73) y acaba al final del

gen 7 (entre los nucleótidos 195 y 233).

La secuencia del extremo 5' del ARN THER-1 parental se determinó por secuenciación directa del ARN, y es 5'-NCUUUUAAAG-3'. La naturaleza del primer nucleótido "N" de la secuencia no se ha determinado. Hasta ahora se ha descrito la secuencia del extremo 5' de tres aislados del virus VGPT: PUR46-PAR, PUR46-BRI y FS772/70, [Eleouet et al., citado *supra;* Page et al., Virus Genes **4**, 289-301 (1990); Sethna et al., J. Virol. **65**, 320-325 (1991)] y todas difieren en el primer nucleótido. La secuencia del líder de los ARNs defectivos debe ser la misma que la del líder del virus parental, dado el intercambio de líderes que se produce en una infección por coronavirus [Makino et al., J. Virol. **57**, 729-737 (1986)].

Los tres ARNs defectivos contienen poliA, dado que se unen a columnas de oligo dT (resultados no mostrados).

1.4.5 Los ARNs B y C conservan la región solapante entre las ORFs 1a y 1b que incluye el motivo responsable de la traslocación (-1) del ribosoma.

De acuerdo con las secuencias asignadas a los genomas DI-C y DI-B, cabe predecir fases abiertas de lectura de 6370 y 10003 nucleótidos respectivamente, que comienzan en el nucleótido 315, contado desde el extremo 5' del genoma. La fase abierta de lectura del ARN DI-C termina en el codón de terminación generado en el sitio de unión de las regiones discontinuas II y III, donde tuvo lugar la deleción interna en la fase abierta de lectura 1b, en la posición 6685 del genoma DI-C. La fase abierta de lectura del genoma DI-B termina en el codón de terminación natural de la ORF1b.

Los dos ARNs defectivos han mantenido la zona solapante entre las ORFs 1a y 1b, que incluye la secuencia de deslizamiento y el motivo de estructura terciaria "lazo falso" *(pseudoknot)*, responsables de la traslocación (-1) del ribosoma en esta zona [Eleouet y col., citado *supra*]. En la

Figura 15 se representan las posibles estructuras secundarias y terciarias del ARN en esta zona. La estructura propuesta para el *pseudoknot* en esta zona por Eleouet y col., es la que se indica en C y D, sin embargo hay otras estructuras posibles (como la indicada en A y B) y se desconoce cuál es la correcta.

Se ha descrito que la traslocación ocurre con una eficiencia del 20% en el VGPT [Eleouet y col., citado *supra*] y permite la traducción continua del gen 1. El hecho de que los ARNs DI-B y DI-C (y probablemente el ARN DI-A) hayan mantenido esta región del genoma parental, sugiere que ésta pueda ser necesaria para la replicación del ARN o para la propagación de los genomas.

Hay otras dos fases abiertas de lectura pequeñas en los genomas defectivos DI-C y DI-B. Una de ellas, previa a la fase de lectura larga, codifica un péptido de tres aminoácidos que se encuentra también en el genoma silvestre y de la que se desconoce su función. La otra fase abierta de lectura comienza en los dos casos en el AUG del gen S, y codifica un péptido de 16 aminoácidos en la DI-C, y un péptido de tamaño variable en la DI-B. No se sabe si estas ORFs son funcionales. Las dos únicas secuencias consenso promotoras de transcripción (CUAAAC) del virus que se han mantenido son precisamente las que preceden al gen 1 y al gen S, en los ARNs defectivos B y C. Estas secuencias se señalan en la Figura 12.

En la Figura 16 se muestra el mapeo de los ARNs A, B y C por hibridación con oligonucleótidos específicos para el virus en ensayos tipo Northern. El ARN del virus THER-1-STp41 se fraccionó en geles de agarosa hasta conseguir una separación clara de los ARNs del genoma parental y DI A, B y C. El ARN se transfirió a filtros de nailon que se hibridaron con varios oligonucleótidos marcados con $^{32}P_i$, que hibridaron con el genoma parental (+), e hibridaron (+) o no (-) con los genomas defectivos. La localización aproximada de las

secuencias complementarias a los oligonucleótidos en el genoma parental se indica con flechas. Su secuencia y posición exactas se indican en la Tabla 3. Todos los oligonucleótidos hibridaron con el genoma parental y dieron los resultados esperados con los ARNs B y C.

Tabla 3

ON	SEC. ID. Nº	Polaridad	Gen en VGPT	Posición en el genoma[a]
1	10	-	Líder	66-91
2	11	-	ORF1a	2151-2170
3	12	-	ORF1a	6121-6140
4	13	-	ORF1a	8684-8703
5	14	-	ORF1a	12261-12280
6	15	-	ORF1b	14148-14167
7	16	-	ORF1b	17363-17381
8	17	-	ORF1b	18792-18811
9	18	-	gen S	1055-1074
10	19	-	gen S	1980-1999
11	20	-	gen S	3600-3619
12	21	-	gen M	97-116
13	22	-	gen N	5-24
14	23	-	UTR-3'	28524-28543

[a]: La posición en el genoma se indica como el numero de bases desde el extremo 5' del genoma viral silvestre para los oligonucleótidos (ON) complementarios al gen 1 (ORF1a y ORF1b) y la región no traducida del extremo 3' (3'-UTR); y desde el primer nucleótido del ATG iniciador del gen correspondiente, al nucleotido 5' del ON en el caso de los que mapean en los genes S, M y N.

EJEMPLO 2

GENERACION DE VECTORES DE EXPRESION

Se ha clonado el ADNc que codifica el ARN DI-C en un plásmido Bluescript II, bajo el control del promotor del fago T7. Este ADNc incluye secuencias poliA, una ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV) y las señales de terminación del fago T7. Uno de estos plásmidos, cuya construcción se muestra en la Figura 17 ha sido denominado pDIC-1. Estos plásmidos se pueden manipular para clonar en ellos los genes heterólogos bajo el control del promotor del gen S que está presente en el genoma defectivo, u otro promotor del VGPT, o una variante de estos con eficiencia aumentada.

El clonaje de los genes heterólogos se hizo después de la ORF1b, siguiendo el codon iniciador (AUG) del gen S, y en fase de lectura con este gen.

A partir de estos ADNc se expresaron ARNs utilizando la polimerasa del fago T7, con los que se transformaron células ST previamente infectadas con el virus colaborador atenuado THER-1, con lo que se rescataron viriones conteniendo el genoma del virus complementador y otros con el genoma defectivo correspondiente. Estos virus, liofilizados en presencia de 2% de suero fetal de ternera se utilizaron como vacuna para la inducción de anticuerpos específicos frente agentes que infectan el tracto gastrointestinal o respiratorio de cerdos, perros y gatos.

El tropismo de los vectores se hizo específico para las especies porcina, canina o felina utilizando los virus complementadores atenuados adecuados.

EJEMPLO 3

Inducción de anticuerpos neutralizantes

3.1 <u>Inducción de protección frente al coronavirus PEDV</u>

Se inmunizaron cerdos utilizando un sistema recombinante constituido por virus complementador (THER-1) y el plásmido

pDIC-1 en el que se había clonado el gen de la glicoproteína S del coronavirus PEDV.

Las inmunizaciones se hicieron por administración de 10^9 ufp por lechón por vía oral.

Se analizó la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero de los animales vacunados a los 15, 30, 45 y 60 días después de la inmunización, determinándose la presencia de anticuerpos específicos para el virus PEDV utilizando un radioinmunoensayo (RIA) [Maniatis et al., citado *supra*].

Con los sueros recogidos a los 45 días después de la inmunización se proporcionó protección completa frente a la infección por el virus PEDV (estirpe SEG86-1) de lechones de 10 días, cuando estos sueros se preincubaron con el virus virulento antes de la administración oral.

3.2 Inducción de protección frente al coronavirus canino

Se inmunizaron perros utilizando un sistema recombinante constituido por virus complementador (coronavirus canino estirpe Fort Dodge) y el plásmido pDIC-1 en el que se había clonado el gen de la glicoproteína S del coronavirus canino (estirpe Fort Dodge).

Las inmunizaciones se hicieron por administración de 10^9 ufp por perro por vía oral.

Se analizó la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero de los animales vacunados a los 15, 30, 45 y 60 días despues de la inmunización, determinándose la presencia de anticuerpos específicos frente al coronavirus canino utilizando RIA.

Con los sueros recogidos a los 45 días después de la inmunización se proporcionó protección completa frente a la infección por el coronavirus canino (estirpe Fort Dodge) de perros de 10 días, cuando estos sueros se preincubaron con el virus virulento antes de la administración oral.

3.3 Inducción de protección frente a infecciones causadas por

el arterivirus PRRSV

Se inmunizaron cerdos utilizando un sistema recombinante constituido por virus complementador (THER-1) y el plásmido pDIC-1 en el que se había clonado la ORF3 y la ORF5 del arterivirus PRRSV (estirpe Fort Dodge).

Las inmunizaciones se hicieron por administración de 10^9 ufp por lechón por vía oral.

Se analizó la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero de los animales vacunados a los 15, 30, 45 y 60 días después de la inmunización, determinándose la presencia de anticuerpos específicos frente a PRRSV utilizando RIA.

Con los sueros recogidos a los 45 días después de la inmunización se proporcionó protección completa frente a la infección por el PRRSV (estirpe Fort Dodge) de lechones de 10 días, cuando estos sueros se preincubaron con el virus virulento antes de la administración oral.

EJEMPLO 4

GENERACION DE VECTORES DE EXPRESION

Siguiendo un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 2 se ha clonado un ADNc que codifica un ARN autoreplicativo en un plásmido Bluescript II, bajo el control del promotor del fago T7. Este ADNc incluye secuencias poliA, una ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV) y las señales de terminación del fago T7. Uno de estos plásmidos, cuya construcción se muestra en la Figura 18 ha sido denominado pDIA-6A.C3. Este plásmido contiene el gen que codifica el anticuerpo monoclonal 6A.C3 que neutraliza el VGPT. Las características del anticuerpo monoclonal 6A.C3 y su construcción se describen en la Tesis Doctoral del Dr. D. Joaquín Castilla Castrillón, titulada "Construcción de animales transgénicos secretores de anticuerpos neutralizantes para coronavirus", Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Diciembre 1996, páginas 43-52, 65-79.

El clonaje del gen heterólogo se hizo después de la ORF1b, siguiendo el codon iniciador (AUG) del gen S, y en fase de lectura con este gen.

A partir de este ADNc se expresaron ARNs utilizando la polimerasa del fago T7, con los que se transformaron células ST previamente infectadas con el virus colaborador atenuado THER-1, con lo que se rescataron viriones conteniendo el genoma del virus complementador y otros con el genoma defectivo correspondiente. Estos virus, liofilizados en presencia de 2% de suero fetal de ternera pueden utilizarse como vectores para la expresión del anticuerpo monoclonal recombinante 6A.C3. El tropismo de los vectores se hizo específico para la especie porcina utilizando el virus complementador atenuado adecuado.

EJEMPLO 5

Expresión de anticuerpos neutralizantes

Se inmunizaron cerdos utilizando un sistema recombinante constituido por virus complementador (THER-1) y el plásmido pDIA-6A.C3 (Ejemplo 4) que contiene la secuencia que codifica el anticuerpo monoclonal recombinante 6A.C3 que neutraliza el VGPT.

Las inmunizaciones se hicieron por administración de 10^9 ufp por lechón por vía oral.

Se analizó la presencia de anticuerpos 6A.C3 neutralizantes en el suero de los animales vacunados a los 15, 30, 45 y 60 días después de la inmunización utilizando un RIA [Maniatis et al., citado *supra*]. Los anticuerpos recombinantes tenían unos títulos RIA superiores a 10^3 y pueden reducir el título del virus infeccioso en más de 10^4 veces.

DEPOSITO DE MICROORGANISMOS

El plásmido denominado pDIC-1, introducido en una bacteria DH-5 derivada de *E. coli*, [DH5/pDIC-1], ha sido

depositado el 6 de Marzo de 1996, en la European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), en Porton Down, Salisbury, Whiltshire SP4 OJG (Reino Unido), correspondiéndole el número de acceso P96030641.

Adicionalmente, el virus complementador atenuado denominado THER-1 ha sido depositado en la ECACC el 6 de Marzo de 1996, correspondiéndole el número de acceso V96030642.

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACION GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: CYANAMID IBERICA, S.A.

(B) DIRECCION: CRISTOBAL BORDIU, 35

(C) CIUDAD: MADRID

(E) PAIS: ESPAÑA

(F) CODIGO POSTAL: 28003

(G) TELEFONO: 34 1 663 91 21

(H) TELEFAX: 34 1 663 94 01

(ii) TITULO DE LA INVENCION:

VECTORES BASADOS EN GENOMAS VIRALES DEFECTIVOS RECOMBINANTES Y SU EMPLEO EN LA FORMULACION DE VACUNAS

(iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 24

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) MEDIO: Diskete

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N° [SEC. ID. N°]: 1:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 1:

GTGAGTGTAG CGTGGCTATA TCTCTTC 27

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 2:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 21 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) N° DE CADENAS: monocatenaria
(D) TOPOLOGIA: lineal
(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
(iii) HIPOTETICA: NO
(iv) ANTI-SENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 2:
CCGTTGTGGT GTCACATTAA C 21

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 3:
(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 32 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) N° DE CADENAS: monocatenaria
(D) TOPOLOGIA: lineal
(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
(iii) HIPOTETICA: NO
(iv) ANTI-SENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 3:
GCCTCTAGAG GAGCTTTGTG GTTCACTTAC AC 32

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 4:
(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 32 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) N° DE CADENAS: monocatenaria
(D) TOPOLOGIA: lineal
(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
(iii) HIPOTETICA: NO
(iv) ANTI-SENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 4:
GCTCTAGAGC GTTTGAATCA ACCCCCAAAA GC 32

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 5:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 5:

GGAATTCCGG GACTATCCTA AGTGTG 26

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 6:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 25 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 6:

GGAATTCCAG CAATACTATT ATCAA 25

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 7:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 7:

TTGATAATAG TATTGCTGGC 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 8:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 8:

GGACTAGTAT CACTATCAAA AGG 23

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 9:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 9:

GATGGATGTT GTGGTGTGAG 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 10:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 10:

CGAGTTGGTG TCCGAAGACA AAATCT 26

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 11:
(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 20 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) N° DE CADENAS: monocatenaria
(D) TOPOLOGIA: lineal
(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
(iii) HIPOTETICA: NO
(iv) ANTI-SENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 11:
ATACGAGCAT CAATATCACC 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 12:
(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 20 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) N° DE CADENAS: monocatenaria
(D) TOPOLOGIA: lineal
(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
(iii) HIPOTETICA: NO
(iv) ANTI-SENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 12:
AGAGTTGCCA CAGACTGCAG 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 13:
(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 20 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) N° DE CADENAS: monocatenaria
(D) TOPOLOGIA: lineal
(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
(iii) HIPOTETICA: NO
(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 13:
CAGCAGATTC AAAGTTACCC 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 14:
(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 20 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) N° DE CADENAS: monocatenaria
(D) TOPOLOGIA: lineal
(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
(iii) HIPOTETICA: NO
(iv) ANTI-SENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 14:
CCATTGTTAA GCCAACAACC 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 15:
(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 20 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) N° DE CADENAS: monocatenaria
(D) TOPOLOGIA: lineal
(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
(iii) HIPOTETICA: NO
(iv) ANTI-SENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 15:
ATCACACTTA GGATAGTCCC 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 16:
(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 19 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) N° DE CADENAS: monocatenaria
(D) TOPOLOGIA: lineal
(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 16:

GTCTAACAAT GTGCCAAGG 19

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 17:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 17:

GCCAGCAATA CTATTATCAA 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 18:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 18:

CACTGTGGCA CCCTTACCTG 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 19:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 19:

GTACACCCAC TATGTTGTCT 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 20:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 20:

TTGCGAGTGA AAACAAATGT 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 21:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 21:

CTCACAATCA GACGCTGTAC 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 22:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 22:

GACACGTTGT CCCTGGTTGG 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 23:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 23:

ACATTTTAAA CAATCACTAG 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 24:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9714 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: bicatenaria

(D) TOPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADNc

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT)

(B) ESTIRPE: THER-1

(C) AISLADO INDIVIDUAL: DI-C

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 24:

NCTTTTAAAG TAAAGTGAGT GTAGCGTGGC TATATCTCTT CTTTTACTTT AACTAGCCTT 60
GTGCTAGATT TTGTCTTCGG ACACCAACTC GAACTAAACG AAATATTTGT CTTTCTATGA 120
AATCATAGAG GACAAGCGTT GATTATTTCC ATTCAGTTTG GCAATCACTC CTTGGAACGG 180
GGTTGAGCGA ACGGTGCAGT AGGGTTCCGT CCCTATTTCG TAAGTCGCCT AGTAGTAGCG 240
AGTGCGGTTC CGCCCGTACA ACGTTGGGTA GACCGGGTTC CGTCCTGTGA TCTCCCTCGC 300
CGGCCGCCAG GAGAATGAGT TCCAAACAAT TCAAGATCCT TGTTAATGAG GACTATCAAG 360
TCAACGTGCC TAGTCTTCCT ATTCGTGACG TGTTACAGGA AATTAAGTAC TGCTACCGTA 420
ATGGATTTGA GGGCTATGTT TTCGTACCAG AATACTGTCG TGACCTAGTT GATTGCGATC 480
GTAAGGATCA CTACGTCATT GGTGTTCTTG GTAACGGAGT AAGTGATCTT AAACCTGTTC 540
TTCTTACCGA ACCCTCCGTC ATGTTGCAAG GCTTTATTGT TAGAGCTAAC TGCAATGGCG 600
TTCTTGAGGA CTTTGACCTT AAAATTGCTC GCACTGTCAG AGGTGCCATA TATGTTGATC 660
AATACATGTG TGGTGCTGAT GGAAAACCAG TCATTGAAGG CGATTTTAAG GACTACTTCG 720
GTGATGAAGA CATCATTGAA TTTGAAGGAG AGGAGTACCA TTGCGCTTGG ACAACTGTGC 780
GCGATGAGAA ACCGCTGAAT CAGCAAACTC TCTTTACCAT TCAGGAAATC CAATACAATC 840
TGGACATTCC TCATAAATTG CCAAACTGTG CTACTAGACA TGTAGCACCA CCAGTCAAAA 900
AGAACTCTAA AATAGTTCTG TCTGAAGATT ACAAGAAGCT TTATGATATC TTCGGATCAC 960
CCTTTATGGG AAATGGTGAC TGTCTTAGCA AATGCTTTGA CACTCTTCAT TTTATCGCTG 1020
CTACTCTTAG ATGCCCGTGT GGTTCTGAAA GTAGCGGCGT TGGAGATTGG ACTGGTTTTA 1080
AGACTGCCTG TTGTGGTCTT TCTGGCAAAG TTAAGGGTGT CACTTTGGGT GATATTAAGC 1140
CTGGTGATGC TGTTGTCACT AGTATGAGCG CAGGTAAGGG AGTTAAGTTC TTTGCCAATT 1200
GTGTTCTTCA ATATGCTGGT GATGTTGAAG GTGTCTCCAT CTGGAAAGTT ATTAAAACTT 1260
TTACAGTTGA TGAGACTGTA TGCACCCCTG GTTTTGAAGG CGAATTGAAC GACTTCATCA 1320
AACCTGAGAG CAAATCACTA GTTGCATGCA GCGTTAAAAG AGCATTCATT ACTGGTGATA 1380
TTGATGATGC TGTACATGAT TGTATCATTA CAGGAAAATT GGATCTTAGT ACCAACCTTT 1440
TTGGTAATGT TGGTCTATTA TTCAAGAAGA CTCCATGGTT TGTACAAAAG TGTGGTGCAC 1500
TTTTTGTAGA CGCTTGGAAA GTAGTAGAGG AGCTTTGTGG TTCACTCACA CTTACATACA 1560
AGCAAATTTA TGAAGTTGTA GCATCACTTT GCACTTCTGC TTTTACGATT GTAAACTACA 1620
AGCCAACATT TGTGGTTCCA GACAATCGTG TTAAAGATCT TGTAGACAAG TGTGTGAAAG 1680
TTCTTGTAAA AGCATTTGAT GTTTTTACGC AGATTATCAC AATAGCTGGT ATTGAGGCCA 1740
AATGCTTTGT GCTTGGTGCT AAATACCTGT TGTTCAATAA TGCACTTGTC AAACTTGTCA 1800
GTGTTAAAAT CCTTGGCAAG AAGCAAAAGG GTCTTGAATG TGCATTCTTT GCTACTAGCT 1860
TGGTTGGTGC AACTGTTAAT GTGACACCTA AAAGAACAGA GACTGCCACT ATCAGCTTGA 1920
ACAAGGTTGA TGATGTTGTA GCACCAGGAG AGGGTTATAT CGTCATTGTT GGTGATATGG 1980
CTTTCTACAA GAGTGGTGAA TATTATTTCA TGATGTCTAG TCCTAATTTT GTTCTTACTA 2040
ACAATGTTTT TAAAGCAGTT AAAGTTCCAT CTTATGACAT CGTTTATGAT GTTGATAATG 2100
ATACCAAAAG CAAAATGATT GCAAAACTTG GTTCATCATT TGAACAAATA CCAACTGGCA 2160
CACAAGATCC AATTCGGTTC TGTATTGAAA ATGAAGTTTG TGTTGTCTGT GGTTGTTGGC 2220
TTAACAATGG TTGCATGTGC GATCGTACTT CTATGCAGAG TTTTACTGTT GATCAAAGTT 2280
ATTTAAACGA GTGCGGGGTT CTAGTGCAGC TCGACTAGAA CCCTGCAATG GTACTGATCC 2340
AGACCATGTT AGTAGAGCTT TTGACATCTA CAACAAAGAT GTTGCGTGTA TTGGTAAATT 2400
CCTTAAGACG AATTGTTCAA GATTTAGGAA TTTGGACAAA CATGATGCCT ACTACATTGT 2460
CAAACGTTGT ACAAAGACCG TTATGGACCA TGAGCAAGTC TGTTATAACG ATCTTAAAGA 2520
TTCTGGTGCT GTTGCTGAGC ATGACTTCTT CACATATAAA GAGGGTAGAT GTGAGTTCGG 2580

TAATGTTGCA CGTAGGAATC TTACAAAGTA CACAATGATG GATCTTTGTT ACGCTATCAG 2640
AAATTTTGAT GAAAAGAACT GTGAAGTTCT CAAAGAAATA CTCGTGACAG TAGGTGCTTG 2700
CACTGAAGAA TTCTTTGAAA ATAAAGATTG GTTTGATCCA GTTGAAAATG AAGCCATACA 2760
TGAAGTTTAT GCAAAACTTG GACCCATTGT AGCCAATGCT ATGCTTAAAT GTGTTGCTTT 2820
TTGCGATGCG ATAGTGGAAA AAGGCTATAT AGGTGTTATA ACACTTGACA ACCAAGATCT 2880
TAATGGCAAT TTCTACGATT TCGGCGATTT CGTGAAGACT GCTCCGGGTT TTGGTTGCGC 2940
TTGTGTTACA TCATATTATT CTTATATGAT GCCTTTAATG GGGATGACTT CATGCTTAGA 3000
GTCTGAAAAC TTTGTGAAAA GTGACATCTA TGGTTCTGAT TATAAGCAGT ATGATTTACT 3060
AGCTTATGAT TTTACCGAAC ATAAGGAGTA CCTTTTCCAA AAATACTTTA AGTACTGGGA 3120
TCGCACATAT CACCCAAATT GTTCTGATTG TACTAGTGAC GAGTGTATTA TTCATTGTGC 3180
TAATTTTAAC ACATTGTTTT CTATGACAAT ACCAATGACA GCTTTTGGAC CACTTGTCCG 3240
TAAAGTTCAT ATTGATGGTG TACCAGTAGT TGTTACTGCA GGTTACCATT TCAAACAACT 3300
TGGTATAGTA TGGAATCTTG ATGTAAAATT AGACACAATG AAGTTGAGCA TGACTGATCT 3360
TCTTAGATTT GTCACAGATC CAACACTTCT TGTAGCATCA AGCCCTGCAC TTTTAGACCA 3420
GCGTACTGTC TGTTTCTCCA TTGCAGCTTT GAGTACTGGT ATTACATATC AGACAGTAAA 3480
ACCAGGTCAC TTTAACAAGG ATTTCTACGA TTTCATAACA GAGCGTGGAT TCTTTGAAGA 3540
GGGATCTGAG TTAACATTAA AACATTTTTT CTTTGCACAG GGTGGTGAAG CTGCTATGAC 3600
AGACTTCAAT TATTATCGCT ACAATAGAGT CACAGTACTT GATATTTGCC AAGCTCAATT 3660
TGTTTACAAA ATAGTTGGCA AGTATTTTGA ATGTTATGAC GGTGGGTGCA TTAATGCTCG 3720
TGAAGTTGTT GTTACAAACT ATGACAAGAG TGCTGGCTAT CCTTTGAACA AATTTGGTAA 3780
AGCTAGACTT TACTACGAAA CTCTTTCATA TGAAGAGCAG GATGCACTTT TTGCTTTAAC 3840
AAAGAGAAAT GTTTTACCCA CAATGACTCA AATGAATTTG AAATACGCTA TTTCTGGTAA 3900
GGCAAGAGCT CGTACAGTAG GAGGAGTTTC ACTTCTTTCT ACCATGACTA CGAGACAATA 3960
TCATCAGAAG CATTTGAAGT CAATTGCTGC AACACGCAAT GCTACTGTGG TCATTGGTTC 4020
AACCAAGTTT TATGGTGGTT GGGACAATAT GCTTAAAAAT TTAATGCGTG ATGTTGATAA 4080
TGGTTGTTTG ATGGGATGGG ACTATCCTAA GTGTGACCGT GCTTTACCTA ATATGATTAG 4140
AATGGCTTCT GCCATGATAT TAGGTTCTAA GCATGTTGGT TGTTGTACAC ATAATGATAG 4200
GTTCTACCGC CTCTCCAATG AGTTAGCTCA AGTACTCACA GAAGTTGTGC ATTGCACAGG 4260
TGGTTTTTAT TTTAAACCTG GTGGTACAAC TAGCGGTGAT GGTACTACAG CATATGCTAA 4320
CTCTGCTTTT AACATCTTTC AAGCTGTTTC TGCTAATGTT AATAAGCTTT TGGGGGTTGA 4380
TTCAAACGCT TGTAACAACG TTACAGTAAA ATCCATACAA CGTAAAATTT ACGATAATTG 4440
TTATCGTAGT AGCAGCATTG ATGAAGAATT TGTTGTTGAG TACTTTAGTT ATTTGAGAAA 4500
ACACTTTTCT ATGATGATTT TATCTGATGA TGGAGTTGTG TGCTACAACA AAGATTATGC 4560
GGATTTAGGT TATGTAGCTG ACATTAATGC TTTTAAAGCA ACACTTTATT ACCAGAATAA 4620
CGTCTTTATG TCCACTTCTA AGTGTTGGGT AGAACCAGAT CTTAGTGTTG GACCACATGA 4680
ATTTTGTTCA CAGCATACAT TGCAGATTGT TGGGCCTGAT GGAGACTACT ATCTTCCCTA 4740
TCCAGACCCG TCCAGAATTT TGTCAGCTGG TGTGTTTGTT GATGACATAG TTAAAACAGA 4800
CAATGTTATT ATGTTAGAAC GTTACGTGTC ATTGGCTATT GACGCATACC CGCTCACAAA 4860
ACACCCTAAG CCTGCTTATC AAAAAGTGTT TTACACTCTA CTAGATTGGG TTAAACATCT 4920
ACAGAAAAAT TTGAATGCAG GTGTTCTTGA TTCGTTTTCA GTGACAATGT TAGAGGAAGG 4980
TCAAGATAAG TTCTGGAGTG AAGAGTTTTA CGCTAGCCTC TATGAAAAGT CCACTGTCTT 5040
GCAAGCTGCA GGCATGTGTG TAGTATGTGG TTCGCAAACT GTACTTCGTT GTGGAGACTG 5100
TCTTAGGAGA CCACTTTTAT GCACGAAATG TGCTTACGAC CATGTTATGG GAACAAAGCA 5160

TAAATTCATT ATGTCTATCA CACCATATGT GTGTAGTTTT AATGGTTGTA ATGTCAATGA 5220
TGTTACAAAG TTGTTTTTAG GTGGTCTTAG TTATTATTGT ATGAACCACA AACCACAGTT 5280
GTCATTCCCA CTCTGTGCTA ATGGCAACGT TTTTGGTCTA TATAAAAGTA GTGCAGTCGG 5340
CTCAGAGGCT GTTGAAGATT TCAACAAACT TGCAGTTTCT GACTGGACTA ATGTAGAAGA 5400
CTACAAACTT GCTAACAATG TCAAGGAATC TCTGAAAATT TTCGCTGCTG AAACTGTGAA 5460
AGCTAAGGAG GAGTCTGTTA AATCTGAATA TGCTTATGCT GTATTAAAGG AGGTTATCGG 5520
CCCTAAGGAA ATTGTACTCC AATGGGAAGC TTCTAAGACT AAGCCTCCAC TTAACAGAAA 5580
TTCAGTTTTC ACGTGTTTTC AGATAAGTAA GGATACTAAA ATTCAATTAG GTGAATTTGT 5640
GTTTGAGCAA TCTGAGTACG GTAGTGATTC TGTTTATTAC AAGAGCACGA GTACTTACAA 5700
ATTGACACCA GGTATGATTT TTGTGTTGAC TTCTCATAAT GTGAGTCCTC TTAAAGCTCC 5760
AATTTTAGTC AACCAAGAAA AGTACAATAC CATATCTAAG CTCTATCCTG TCTTTAATAT 5820
AGCGGAGGCC TATAATACAC TGGTTCCTTA CTACCAAATG ATAGGTAAGC AAAAATTTAC 5880
AACTATCCAA GGTCCTCCTG GTAGCGGTAA ATCTCATTGT GTTATAGGTT TGGGTTTGTA 5940
TTACCCTCAG GCGAGAATAG TCTACACTGC ATGTTCTCAT GCGGCTGTAG ACGCTTTATG 6000
TGAAAAAGCA GCCAAAAACT TCAATGTTGA TAGATGTTCA AGGATAATAC CTCAAAGAAT 6060
CAGAGTTGAT TGTTACACAG GCTTTAAGCC TAATAACACC AATGCGCAGT ACTTGTTTTG 6120
TACTGTTAAT GCTCTACCAG AAGCAAGTTG TGACATTGTT GTAGTTGATG AGGTCTCTAT 6180
GTGTACTAAT TATGATCTTA GTGTCATAAA TAGCCGACTG AGTTACAAAC ATATTGTTTA 6240
TGTTGGAGAC CCACAGCAGC TACCAGCTCC TAGAACTTTG ATTAATAAGG GTGTACTTCA 6300
ACCGCAGGAT TACAATGTTG TAACCAAAAG AATGTGCACA CTAGGACCTG ATGTCTTTTT 6360
GCATAAATGT TACAGGTGCC CAGCTGAAAT TGTTAAAACA GTCTCTGCAC TTGTTTATGA 6420
AAATAAATTT GTACCTGTCA ACCCAGAATC AAAGCAGTGC TTCAAAATGT TTGTAAAAGG 6480
TCAGATTCAG ATTGAGTCTA ACTCTTCTAT AAACAACAAG CAACTAGAGG TTGTCAAGGC 6540
CTTTTTAGCA CATAATCCAA AATGGCGTAA AGCTGTTTTC ATCTCACCCT ATAATAGTCA 6600
AAATTATGTT GCTCGGCGTC TTCTTGGTTT GCAAACGCAA ACTGTGGATT CCGCTCAGGG 6660
TAGTGAGTAT GATTACGTCA TCTAGCTGCT CTGAAGATTT TTAATCCTGC TGCAATTCAC 6720
GATGTGGGTA ATCCAAAAGG CATCCGTTGT GCTACAACAC CAATACCATG GTTTTGTTAT 6780
GATCGTGATC CTATTAATAA CAATGTTAGA TGTCTGGATT ATGACTATAT GGTACATGGT 6840
CAAATGAATG GTCTTATGTT ATTTTGGAAC TGTAATGTAG ACATGTACCC AGAGTTTTCA 6900
ATTGTTTGTA GATTTGATAC TCGCACTCGC TCTAAATTGT CTTTAGAAGG TTGTAATGGT 6960
GGTGCATTGT ATGTTAATAA CCATGCTTTC CACACACCAG CTTATGATAG AAGAGCTTTT 7020
GCTAAGCTTA AACCTATGCC ATTCTTTTAC TATGATGATA GTAATTGTGA ACTTGTTGAT 7080
GGGCAACCTA ATTATGTACC ACTTAAGTCA AATGTTTGCA TAACAAAATG CAACATTGGT 7140
GGTGCTGTCT GCAAGAAGCA TGCTGCTCTT TACAGAGCGT ATGTTGAGGA TTACAACATT 7200
TTTATGCAGG CTGGTTTTAC AATATGGTGT CCTCAAAACT TTGACACCTA TATGCTTTGG 7260
CATGGTTTTG TTAATAGCAA AGCACTTCAG AGTCTAGAAA ATGTGGCTTT TAATGTCGTT 7320
AAGAAAGGTG CCTTCACCGG TTTAAAAGGT GACTTACCAA CTGCTGTTAT TGCTGACAAA 7380
ATAATGGTAA GAGATGGACC TACTGACAAA TGTATTTTTA CAAATAAGAC TAGTTTACCT 7440
ACAAATGTAG CTTTTGAGTT ATATGCAAAA CGCAAACTTG GACTCACACC TCCATTAACA 7500
ATACTTAGGA ATTTAGGTGT TGTCGCAACA TATAAGTTTG TGTTGTGGGA TTATGAAGCT 7560
GAACGTCCTT TCTCAAATTT CACTAAGCAA GTGTGTTCCT ACACTGATCT TGATAGTGAA 7620
GTTGTAACAT GTTTTGATAA TAGTATTGCT GGCTCTTTTG AGCGTTTTAC TACTACAAGA 7680
GATGCAGTGC TTATTTCTAA TAACGCTGTG AAAGGGCTTA GTGCCATTAA ATTACAATAT 7740

GGCCTTTTGA ATGATCTACC TGTAAGTACT GTTGGAAATA AACCTGTCAC ATGGTATATC 7800
TATGTGCGCA AGAATGGTGA GTACGTCGAA CAAATCGATA GTTACTATAC ACAGGGACGT 7860
ACTTTTGAAA CCTTCAAACC TCGTAGTACA ATGGAAGAAG ATTTTCTTAG TATGGATACT 7920
ACACTCTTCA TCCAAAAGTA TGGTCTTGAG GATTATGGTT TTGAACACGT TGTATTTGGA 7980
GATGTCTCTA AAACTACCAT TGGTGGTATG CATCTTCTTA TATCGCAAGT GCGCCTTGCA 8040
AAAATGGGTT TGTTTTCCGT TCAAGAATTT ATGAATAATT CTGACAGTAC ACTGAAAAGT 8100
TGTTGTATTA CATATGCTGA TGATCCATCT TCTAAGAATG TGTGCACTTA TATGGACATA 8160
CTCTTGGACG ATTTTGTGAC TATCATTAAG AGCTTAGATC TTAATGTTGT GTCCAAAGTT 8220
GTGGATGTCA TTGTAGATTG TAAGGCATGG AGATGGATGT TGTGGTGTGA GAATTCACAT 8280
ATTAAAACCT TCTATCCACA ACTCCAATCT GCTGAATGGA ATCCCGGCTA TAGCATGCCT 8340
ACACTGTACA AAATCCAGCG TATGTGTCTC GAACGGTGTA ATCTCTACAA TTATGGTGCA 8400
CAAGTGAAAT TACCTGATGG CATTACTACT AATGTCGTTA AGTATACTCA GTTGTGTCAA 8460
TACCTTAACA CTACTACATT GTGTGTACCA CACAAAATGC GTGTATTGCA TTTAGGAGCT 8520
GCTGGTGCAT CTGGTGTTGC TCCTGGTAGT ACTGTATTAA GAAGATGGTT ACCAGATGAT 8580
GCCATATTGG TTGATAATGA TTTGAGAGAT TACGTTTCCG ACGCAGACTT CAGTGTTACA 8640
GGTGATTGTA CTAGTCTTTA CATCGAAGAC AAGTTTGATT TGCTCGTCTC TGATTTATAT 8700
GATGGCTCCA CAAAATCAAT TGACGGTGAA AACACGTCGA AAGATGGTTT CTTTACTTAT 8760
ATTAATGGTT TCATTAAAGA GAAACTGTCA CTTGGTGGAT CTGTTGCCAT TAAAATCACG 8820
GAATTTAGTT GGAATAAAGA TTTATATGAA TTGATTCAAA GATTTGAGTA TTGGACTGTG 8880
TTTTGTACAA GTGTTAACAC GTCATCATCA GAAGGCTTTC TGATTGGTAT TAACTACTTA 8940
GGACCATACT GTGACAAAGC AATAGTAGAT GGAAATATAA TGCATGCCAA TTATATATTT 9000
TGGAGAAACT CTACAATTAT GGCTCTATCA CATAACTCAG TCCTAGACAC TCCTAAATTC 9060
AAGTGTCGTT GTAACAACGC ACTTATTGTT AATTTAAAAG AAAAAGAATT GAATGAAATG 9120
GTCATTGGAT TACTAAGGAA GGGTAAGTTG CTCATTAGAA ATAATGGTAA GTTACTAAAC 9180
TTTGGTAACC ACTTCGTTAA CACACCATGA AAAAATGCTG TATTTATTAC AGTTTTAATC 9240
TTACTACTAA TTGGTAGACT CCAATTATTA GAAAGACTAT TACTTAATCA CTCTTTCAAT 9300
CTTAAAACTG TCAATGACTT TAATATCTTA TATAGGAGTT TAGCAGAAAC CAGATTACTA 9360
AAAGTGGTGC TTCGAGTAAT CTTTCTAGTC TTACTAGGAT TTTGCTGCTA CAGATTGTTA 9420
GTCACATTAA TGTAAGGCAA CCCGATGTCT AAAACTGGTT TTTCCGAGGA ATTACTGGTC 9480
ATCGCGCTGT CTACTCTTGT ACAGAATGGT AAGCACGTGT AATAGGAGGT ACAAGCAACC 9540
CTATTGCATA TTAGGAAGTT TAGATTTGAT TTGGCAATGC TAGATTTAGT AATTTAGAGA 9600
AGTTTAAAGA TCCGCTACGA CGAGCCAACA ATGGAAGAGC TAACGTCTGG ATCTAGTGAT 9660
TGTTTAAAAT GTAAAATTGT TTGAAAATTT TCCTTTTGAT AGTGATACAA AAAA 9714

REIVINDICACIONES

1. Un genoma viral defectivo que comprende el genoma de un virus parental que tiene las señales de reconocimiento de la replicasa viral localizadas en los extremos 3' y 5', que comprende además deleciones internas, y en el que dicho genoma viral defectivo depende de un virus complementador para su replicación.

2. Un genoma según la reivindicación 1, que comprende, además, la secuencia completa que codifica la replicasa del virus parental.

3. Un genoma según las reivindicaciones anteriores, en el que dicho virus parental es un coronavirus.

4. Un genoma según las reivindicaciones anteriores, que comprende un genoma defectivo de un coronavirus porcino, canino o felino.

5. Un genoma según la reivindicación 4, que comprende un genoma defectivo del virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT).

6. Un genoma según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho virus complementador es el virus parental.

7. Un vector de expresión basado en un genoma viral defectivo recombinante que expresa al menos un antígeno capaz de inducir respuestas inmunes sistémicas y secretoras, que comprende un genoma viral defectivo según las reivindicaciones 1 a 6, o su correspondiente ADN complementario (ADNc), y al menos, una secuencia de ADN que codifica un antígeno capaz de conferir inmunidad

sistémica y en mucosas.

8. Un vector según la reivindicación 7, que comprende más de una secuencia de ADN, cada una de las cuales codifica un antígeno distinto capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas.

9. Un vector de expresión basado en un genoma viral defectivo recombinante que expresa al menos un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso, que comprende un genoma viral defectivo según las reivindicaciones 1 a 6, o su correspondiente ADN complementario (ADNc), y al menos, una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso.

10. Un vector según la reivindicación 9, que comprende más de una secuencia de ADN, cada una de las cuales codifica un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso.

11. Un sistema recombinante basado en virus defectivos recombinantes que expresan, al menos, un antígeno capaz de inducir inmunidad sistémica y en mucosas, que comprende:

a) un vector de expresión recombinante basado en un genoma viral defectivo según las reivindicaciones 7 u 8, que contiene, al menos, una secuencia de ADN que codifica un antígeno capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas; y

b) un virus complementador.

12. Un sistema según la reivindicación 11, en el que dicho vector de expresión comprende más de una secuencia de ADN, cada una de las cuales codifica un antígeno

distinto capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas.

13. Un sistema según la reivindicación 11, que comprende distintos vectores de expresión cada uno de los cuales contiene una secuencia de ADN distinta que codifica un antígeno distinto capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas.

14. Un sistema según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que dicho virus complementador es el virus parental del que deriva el genoma viral defectivo.

15. Un sistema según la reivindicación 14, en el que dicho virus complementador proporciona las proteínas funcionales y estructurales para la replicación y encapsidación del genoma defectivo.

16. Un sistema según la reivindicación 14, en el que dicho virus complementador proporciona las proteínas estructurales para la encapsidación del genoma defectivo.

17. Un sistema recombinante basado en virus defectivos recombinantes que expresan, al menos, un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso, que comprende:

a) un vector de expresión recombinante basado en un genoma viral defectivo según las reivindicaciones 9 ó 10, que contiene, al menos, una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso, y

b) un virus complementador.

18. Un sistema según la reivindicación 17, en el que

dicho vector de expresión comprende más de una secuencia de ADN, cada una de las cuales codifica un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso.

19. Un sistema según la reivindicación 17, que comprende distintos vectores de expresión cada uno de los cuales contiene una secuencia de ADN distinta que codifica un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso.

20. Un sistema según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en el que dicho virus complementador es el virus parental del que deriva el genoma viral defectivo.

21. Un sistema según la reivindicación 20, en el que dicho virus complementador proporciona las proteínas funcionales y estructurales para la replicación y encapsidación del genoma defectivo.

22. Un sistema según la reivindicación 20, en el que dicho virus complementador proporciona las proteínas estructurales para la encapsidación del genoma defectivo.

23. Una vacuna capaz de inducir protección en animales frente a un agente infeccioso, que comprende una cantidad adecuada de un sistema recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 22, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

24. Una vacuna según la reivindicación 23, en la que dicho sistema recombinante comprende un vector de expresión que contiene una secuencia de ADN que codifica un antígeno capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas.

25. Una vacuna según la reivindicación 23, en la que dicho sistema recombinante comprende un vector de expresión que contiene más de una secuencia de ADN, cada una de las cuales codifica un antígeno distinto capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas.

26. Una vacuna según la reivindicación 23, en la que dicho sistema recombinante comprende distintos vectores de expresión cada uno de los cuales contiene al menos una secuencia de ADN distinta que codifica un antígeno distinto capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas.

27. Una vacuna según la reivindicación 23, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos porcinos, en la que el sistema recombinante comprende al menos un vector de expresión que contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un antígeno de un patógeno porcino.

28. Una vacuna según la reivindicación 23, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos porcinos, en la que el sistema recombinante comprende un vector de expresión que contiene más de una secuencia de ADN, cada una de las cuales codifica un antígeno distinto de un patógeno porcino.

29. Una vacuna según la reivindicación 23, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos porcinos, en la que el sistema recombinante comprende distintos vectores de expresión cada uno de los cuales contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un antígeno de un patógeno porcino.

30. Una vacuna según las reivindicaciones 27 a 29, en

la que dicho patógeno porcino se selecciona de un grupo constituido esencialmente por: Actinobacillus suis, Actinobacillus pleuropneumoniae, Haemophilus parasuis, Parvovirus porcino, Leptospira, Escherichia coli, Erysipelotrix rhusiopathiae, Pasterella multocida, Bordetella bronchiseptica, Clostridium sp., Serpulina hydiosenteriae, Mycoplasma hyopneumoniae, virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), coronavirus respiratorio porcino, rotavirus, o contra los patógenos causantes del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, la enfermedad de Aujeszky (Pseudorabies), influenza porcina o gastroenteritis transmisible y el agente etiológico de la rinitis atrófica y de la ileitis proliferativa.

31. Una vacuna según la reivindicación 23, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos caninos, en la que el sistema recombinante comprende al menos un vector de expresión que contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un antígeno de un patógeno canino.

32. Una vacuna según la reivindicación 23, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos caninos, en la que el sistema recombinante comprende un vector de expresión que contiene más de una secuencia de ADN, cada una de las cuales codifica un antígeno distinto de un patógeno canino.

33. Una vacuna según la reivindicación 23, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos caninos, en la que el sistema recombinante comprende distintos vectores de expresión cada uno de los cuales contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un antígeno de un patógeno canino.

34. Una vacuna según las reivindicaciones 31 a 33, en la que dicho patógeno canino se selecciona de un grupo constituido esencialmente por: herpesvirus caninos, adenovirus canino tipos 1 y 2, parvovirus canino tipos 1 y 2, reovirus canino, rotavirus canino, coronavirus canino, virus de la parainfluenza canina, virus de la influenza canina, virus del moquillo (Distemper virus), virus de la rabia, retrovirus y calicivirus canino.

35. Una vacuna según la reivindicación 23, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos felinos, en la que el sistema recombinante comprende al menos un vector de expresión que contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un antígeno de un patógeno felino.

36. Una vacuna según la reivindicación 23, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos felinos, en la que el sistema recombinante comprende un vector de expresión que contiene más de una secuencia de ADN, cada una de las cuales codifica un antígeno distinto de un patógeno felino.

37. Una vacuna según la reivindicación 23, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos felinos, en la que el sistema recombinante comprende distintos vectores de expresión cada uno de los cuales contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un antígeno de un patógeno felino.

38. Una vacuna según las reivindicaciones 35 a 37, en la que dicho patógeno felino se selecciona de un grupo esencialmente constituido por: calicivirus del gato, virus de la inmuno-deficiencia felina, herpesvirus felinos, virus de la panleucopenia felina, reovirus felino,

rotavirus felino, coronavirus felino, virus de la peritonitis infecciosa del gato, virus de la rabia, Chlamydia psittaci felina y virus de la leucemia felina.

39. Una vacuna según la reivindicación 23, en la que dicho sistema recombinante comprende un vector de expresión que contiene una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso.

40. Una vacuna según la reivindicación 23, en la que dicho sistema recombinante comprende un vector de expresión que contiene más de una secuencia de ADN, cada una de las cuales codifica un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso.

41. Una vacuna según la reivindicación 23, en la que dicho sistema recombinante comprende distintos vectores de expresión cada uno de los cuales contiene al menos una secuencia de ADN distinta que codifica un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso.

42. Una vacuna según la reivindicación 23, adecuada para conferir inmunidad contra un agente infeccioso porcino, en la que el sistema recombinante comprende al menos un vector de expresión que contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo que proporciona protección contra dicho agente infeccioso porcino.

43. Una vacuna según la reivindicación 42, en la que el sistema recombinante comprende al menos un vector de expresión que contiene al menos una secuencia de ADN que codifica el anticuerpo monoclonal identificado como 6A.C3 capaz de neutralizar el virus de la gastroenteritis

porcina transmisible (VGPT).

44. Una vacuna según la reivindicación 23, en la que el virus complementador del sistema recombinante comprende un coronavirus.

45. Una vacuna según la reivindicación 44, en la que dicho coronavirus se selecciona del grupo formado por coronavirus porcinos, caninos y felinos.

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario PCT.1/97	Solicitud internacional nº PCT / E S 97 / 0 0 0 5 9

INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO

(Regla 13 bis del PCT)

REC'D 0 1 APR 1997
WIPO PCT

A. Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en la descripción
página 41 ,línea 35

B. **IDENTIFICACION DEL DEPOSITO** Otros depósitos están identificados en una hoja suplementaria [X]

Nombre de la institución de depósito
EUROPEAN COLLECTION OF ANIMAL CELL CULTURES (ECACC)

Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito postal y el país)
Porton Down
Salisbury
Whiltshire SP4 0JG
Reino Unido

Fecha de depósito	nº de orden
6 de Marzo de 1.996 (06.03.96)	P96030641

C. **INDICACIONES SUPLEMENTARIAS (en caso necesario)** Se adjunta una hoja separada para la continuación de estos datos []

D. **ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES**
(caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designados)

E. **INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO** (en caso necesario)

Las indicaciones numeradas a continuación serán presentadas posteriormente en la Oficina internacional (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejem. "nº de orden del depósito")

Reservado a la oficina receptora

[X] Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la solicitud internacional

Funcionario autorizado

Reservado a la Oficina internacional

[] Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el:

Funcionario autorizado

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario	Solicitud internacional nº
PCT.1/97	PCT/ES97/00059

INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO

(Regla 13 bis del PCT)

REC'D 01 APR 1997
WIPO PCT

A. Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en la descripción
página 42 ,línea 6

B. **IDENTIFICACION DEL DEPOSITO** Otros depósitos están identificados en una hoja suplementaria [X]

Nombre de la institución de depósito
EUROPEAN COLLECTION OF ANIMAL CELL CULTURES (ECACC)

Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito postal y el país)
Porton Down
Salisbury
Whiltshire SP4 0JG
Reino Unido

Fecha de depósito	nº de orden
6 de Marzo de 1.996 (06.03.96)	V96030642

C. **INDICACIONES SUPLEMENTARIAS (en caso necesario)** Se adjunta una hoja separada para la continuación de estos datos []

D. **ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES**
(caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designados)

E. **INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO** (en caso necesario)

Las indicaciones numeradas a continuación serán presentadas posteriormente en la Oficina internacional (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejem. "nº de orden del depósito")

Reservado a la oficina receptora

[X] Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la solicitud internacional

Funcionario autorizado

Reservado a la Oficina internacional

[] Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el:

Funcionario autorizado

Formulario PCT/RO/134 (Julio 1992)

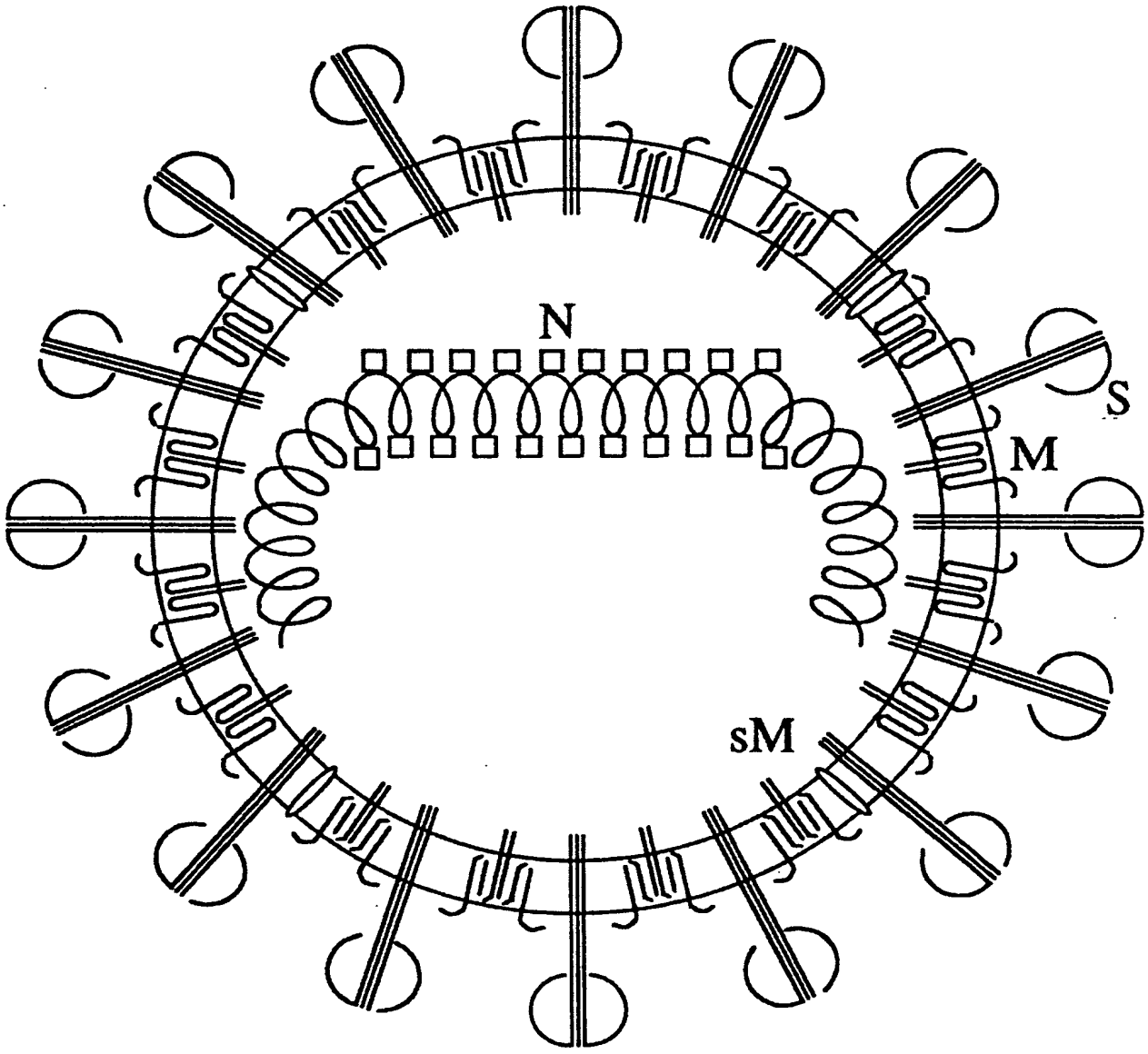


FIG. 1

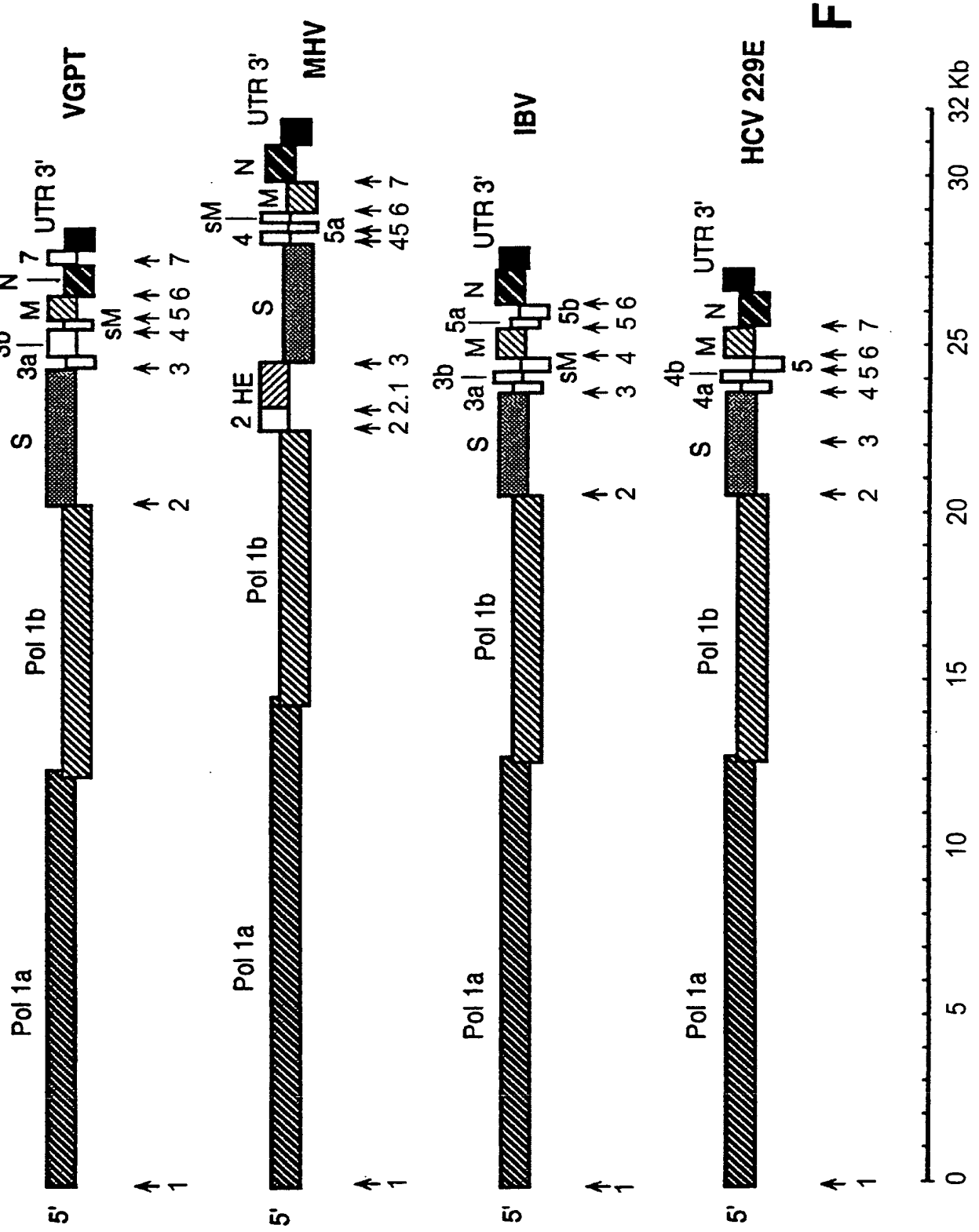

VGPT
MHV
IBV
HCV 229E
5'
Pol 1a
Pol 1b
S
2 HE
3a
3b
4a
4b
5a
5b
M
N
sM
UTR 3'
0
5
10
15
20
25
30
32 Kb

FIG. 2

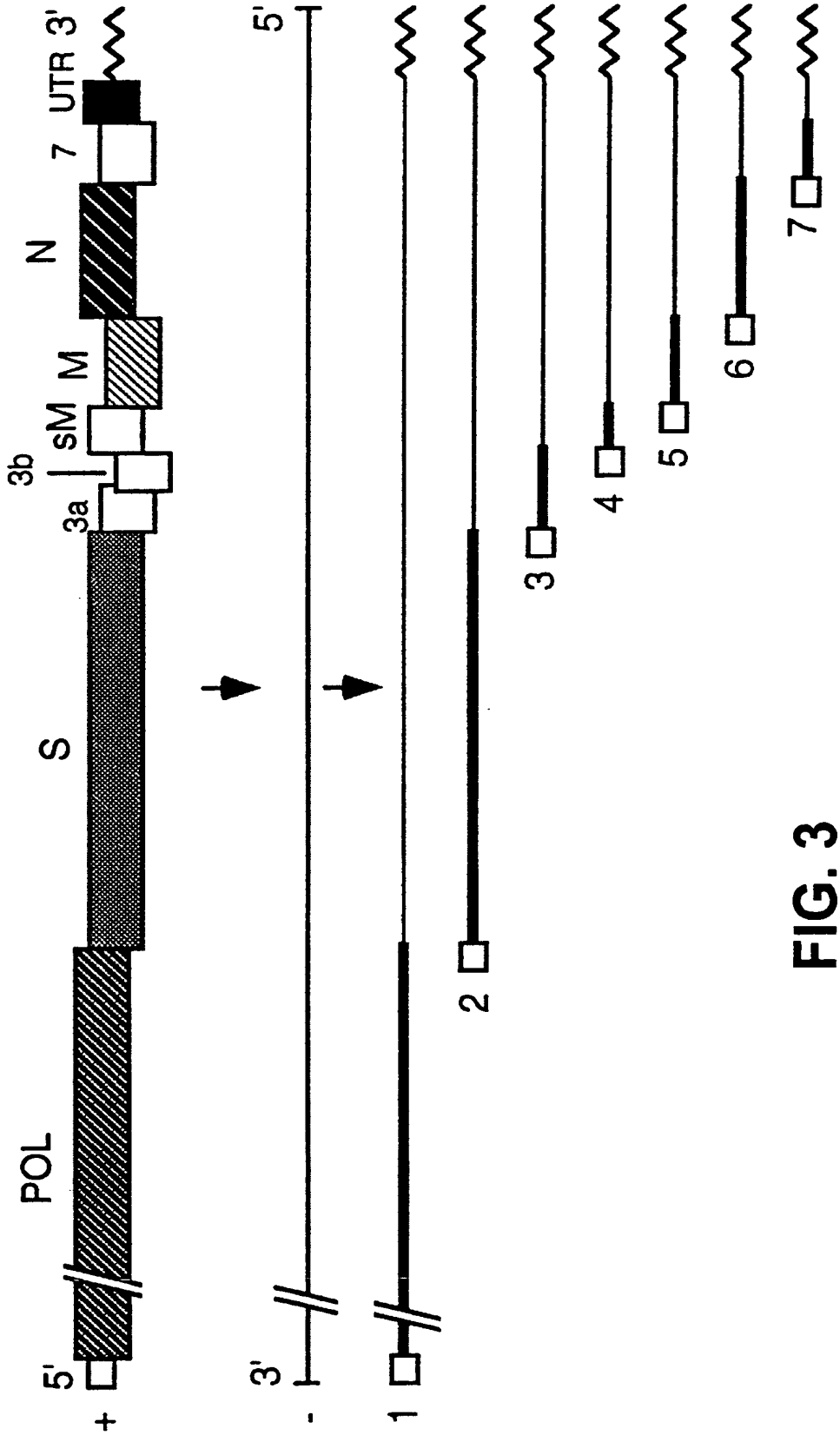


FIG. 3

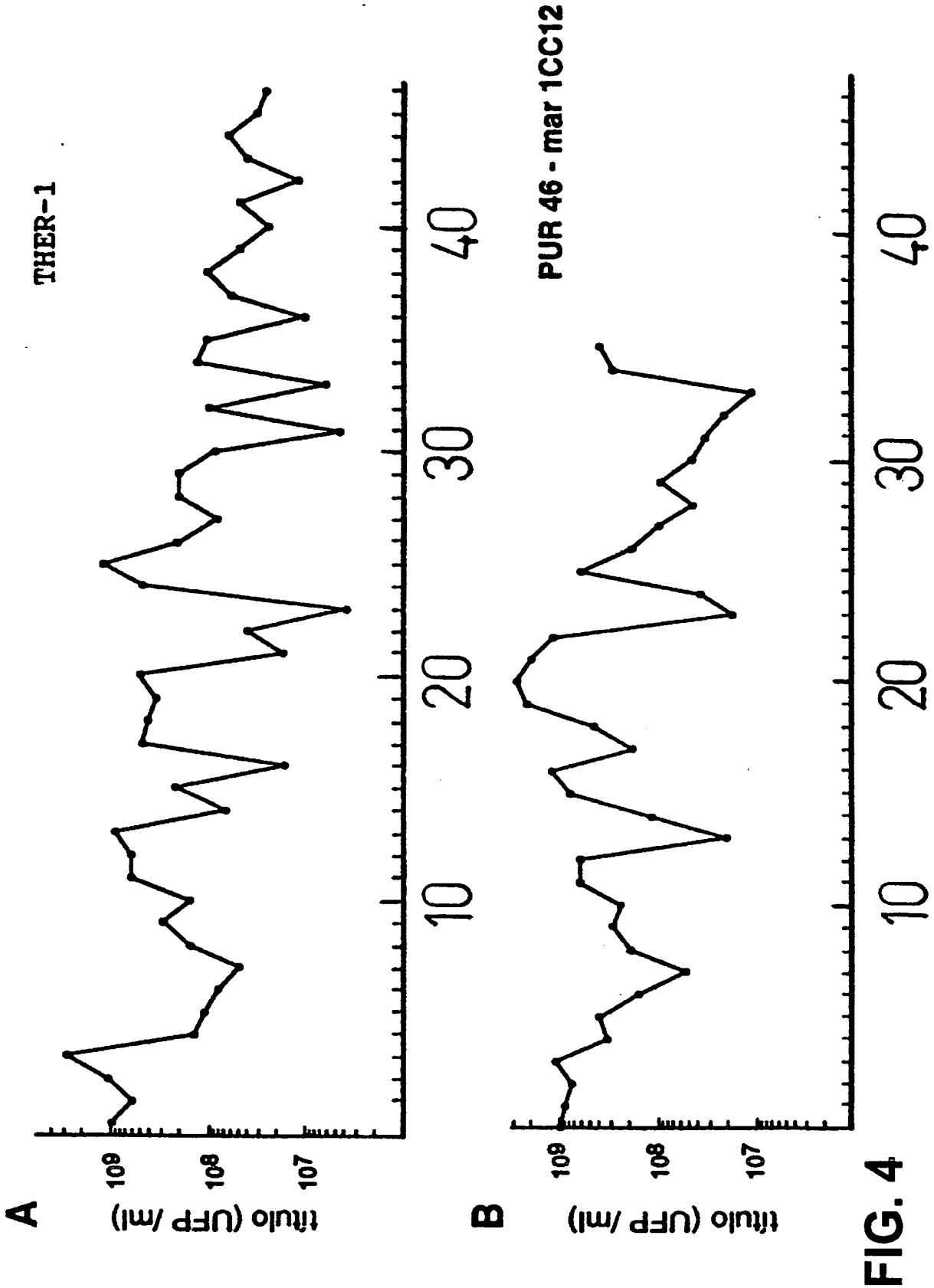

A
THER-1
título (UFP /ml)
10^9
10^8
10^7
10
20
30
40
B
PUR 46 - mar 1CC12
título (UFP /ml)
10^9
10^8
10^7
10
20
30
40

FIG. 4

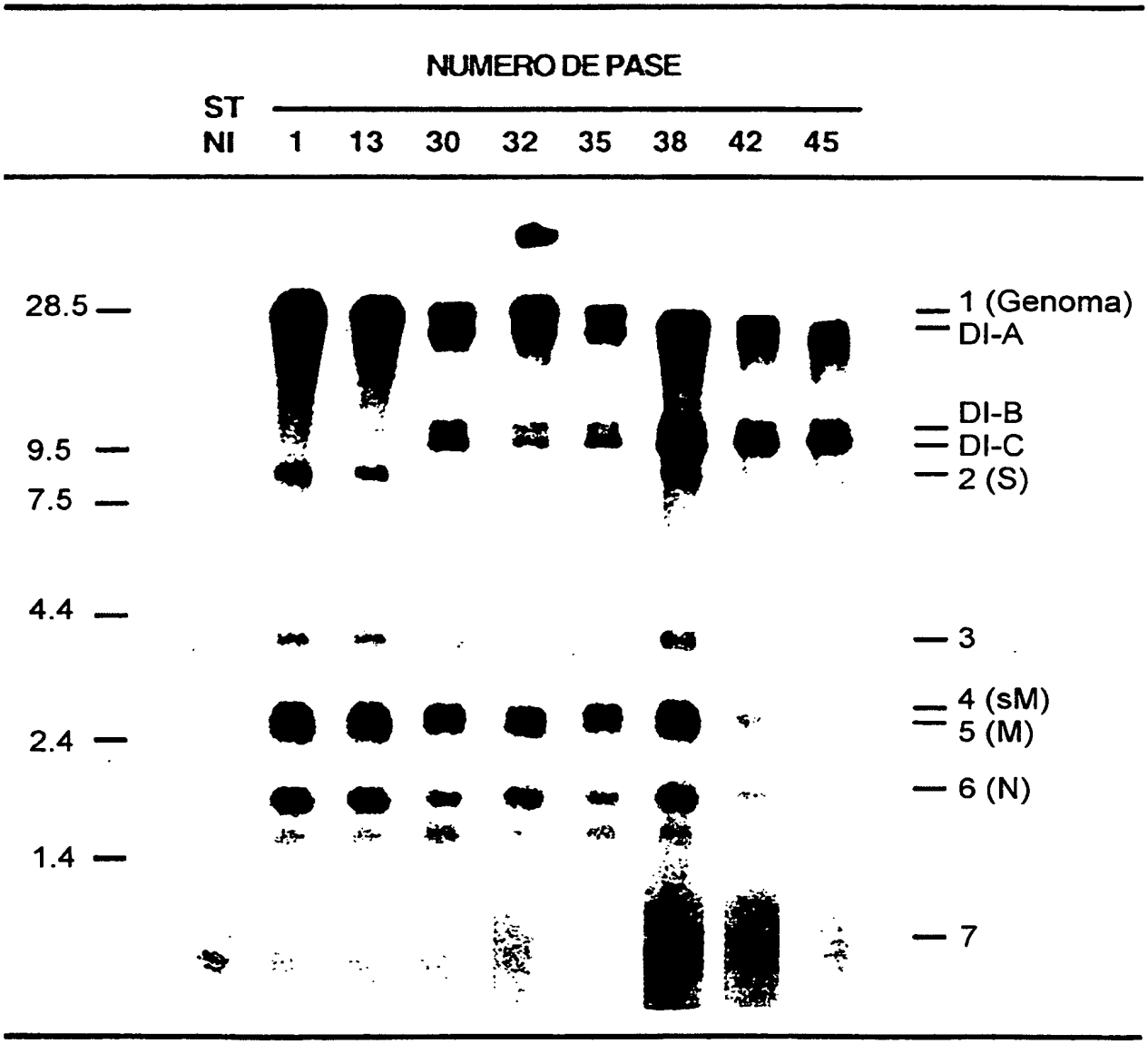

NUMERO DE PASE
ST
NI
1
13
30
32
35
38
42
45
28.5
9.5
7.5
4.4
2.4
1.4
1 (Genoma)
DI-A
DI-B
DI-C
2 (S)
3
4 (sM)
5 (M)
6 (N)
7

FIG. 5

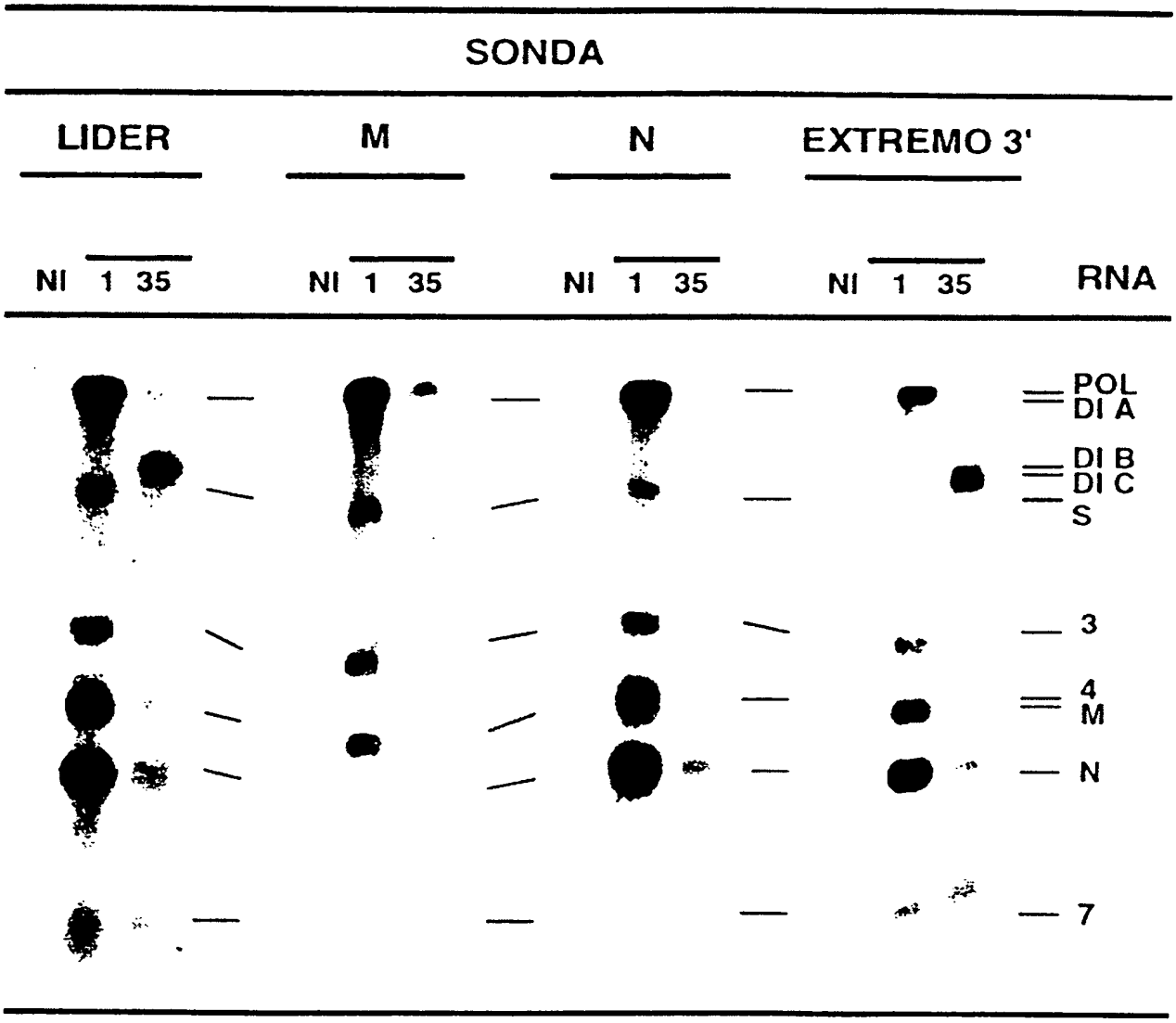

SONDA
LIDER
M
N
EXTREMO 3'
NI 1 35
NI 1 35
NI 1 35
NI 1 35
RNA
POL
DI A
DI B
DI C
S
3
4
M
N
7

FIG. 6

THER-1					
p1	p41				
mdi	mdi (ufp/ célula)				
10	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10	RNA

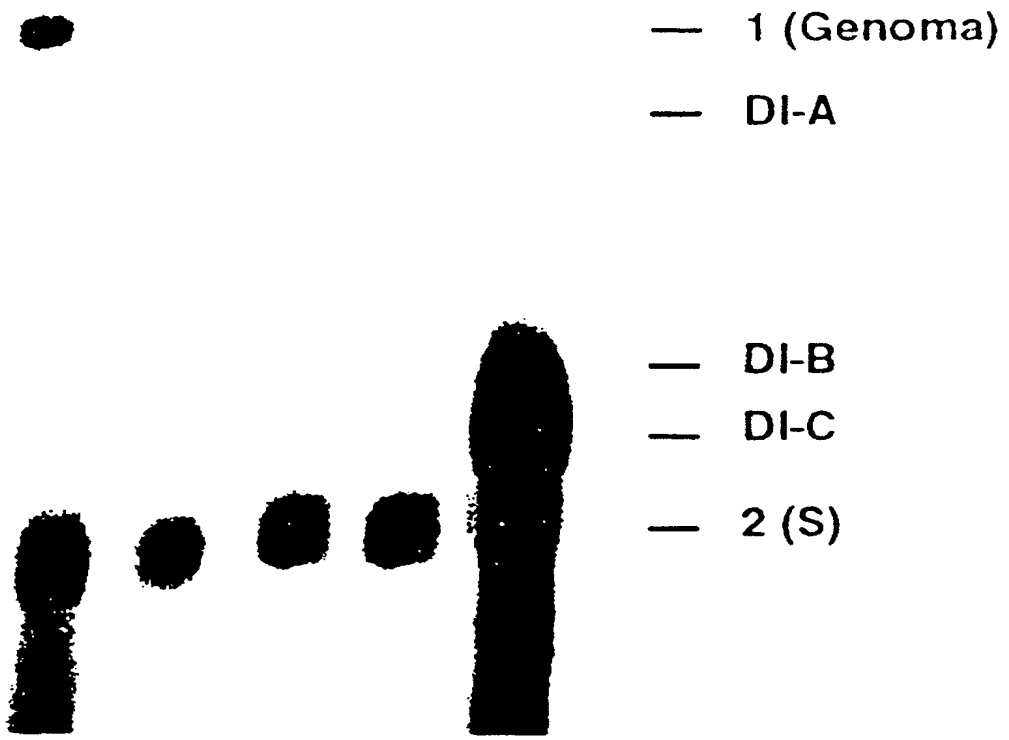


FIG.7

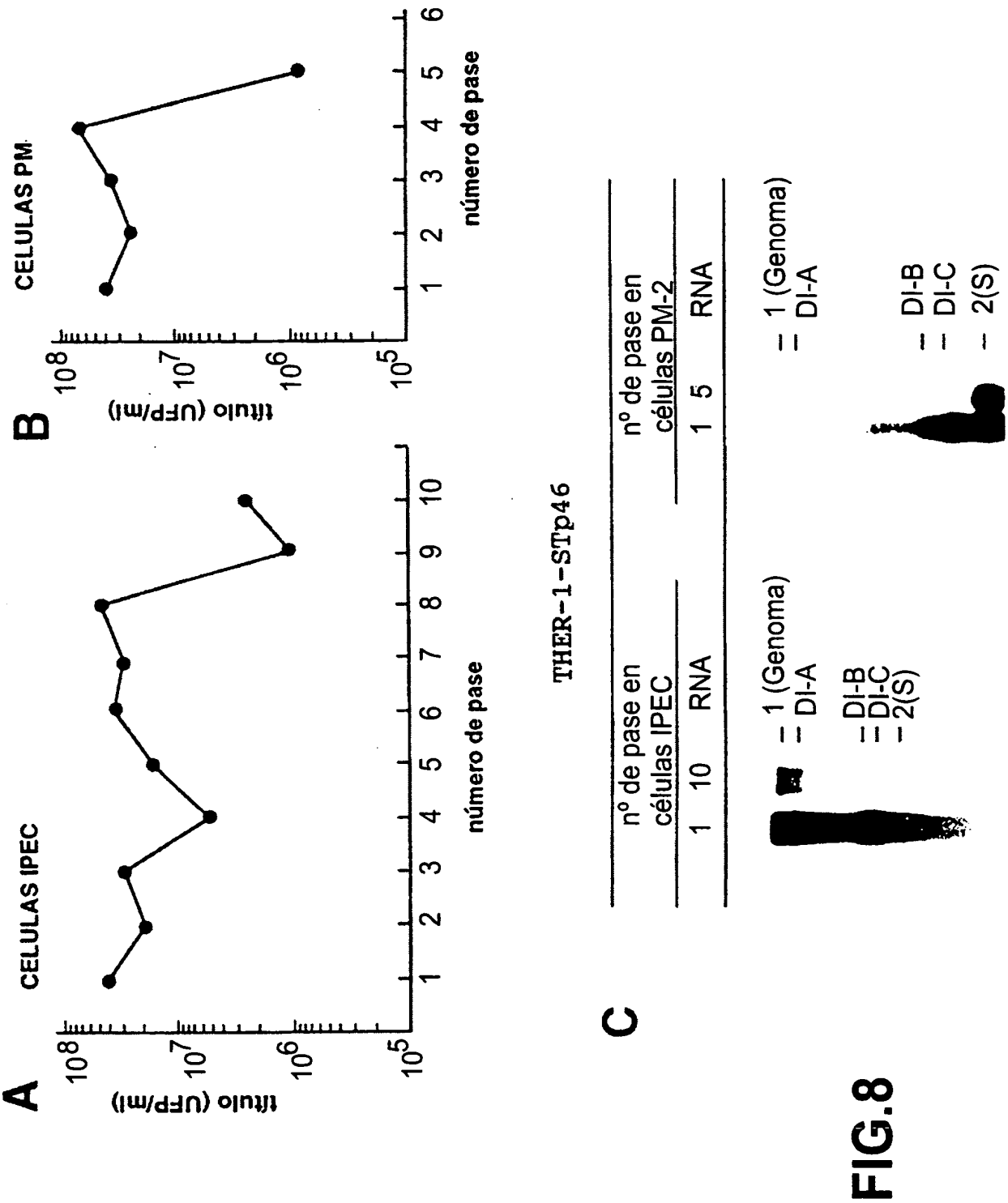
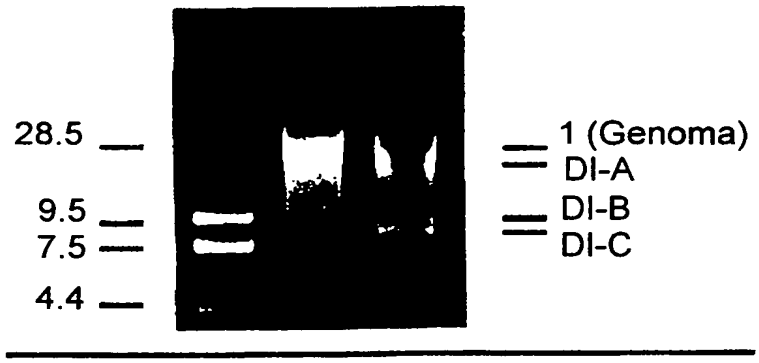

A
CELULAS IPEC
título (UFP/ml)
10^8
10^7
10^6
10^5
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
número de pase
B
CELULAS PM
título (UFP/ml)
10^8
10^7
10^6
10^5
1 2 3 4 5 6
número de pase
C
THER-1-STp46
nº de pase en células IPEC
1 10 RNA
= 1 (Genoma)
= DI-A
= DI-B
= DI-C
= 2(S)
nº de pase en células PM-2
1 5 RNA
= 1 (Genoma)
= DI-A
= DI-B
= DI-C
= 2(S)

FIG.8

A


M M p1 p41
28.5
9.5
7.5
4.4
1 (Genoma)
DI-A
DI-B
DI-C

B

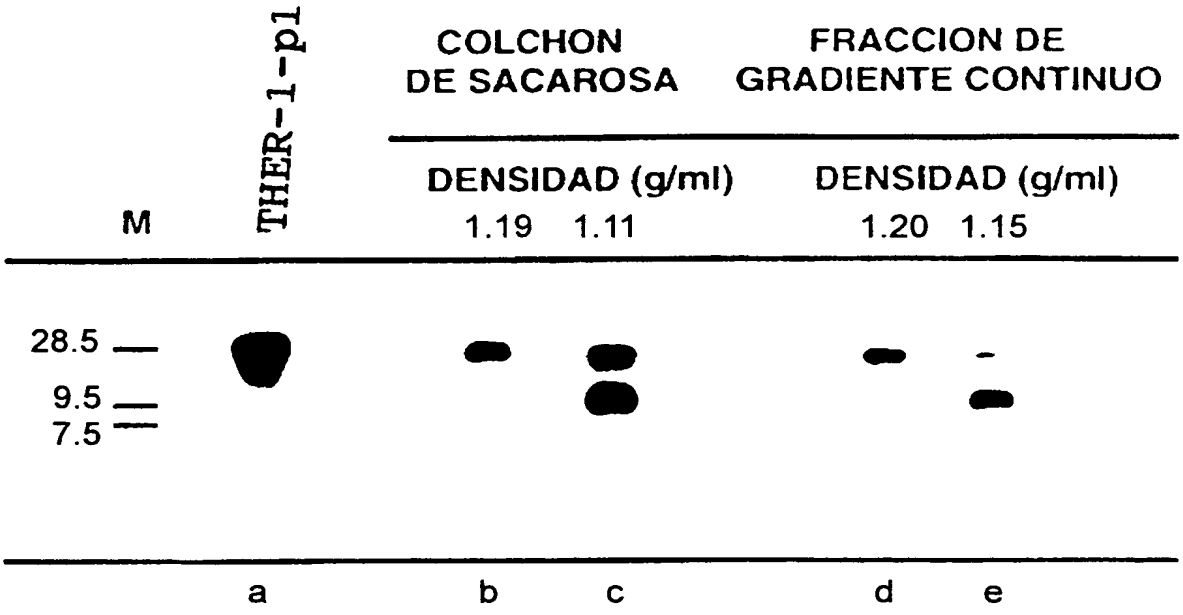

M
THER-1-p1
COLCHON DE SACAROSA
FRACCION DE GRADIENTE CONTINUO
DENSIDAD (g/ml)
1.19 1.11
DENSIDAD (g/ml)
1.20 1.15
28.5
9.5
7.5
a
b
c
d
e

FIG.9

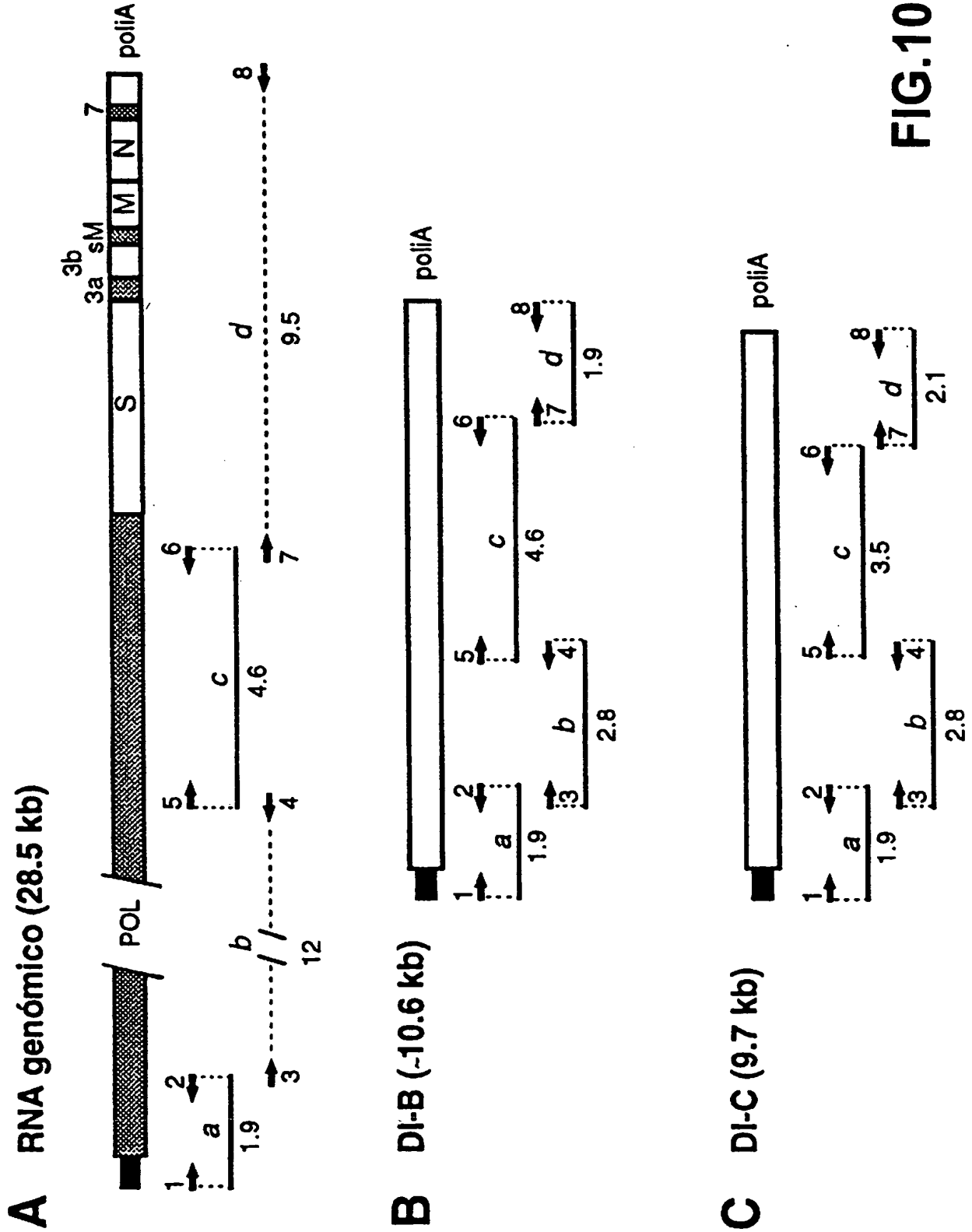

A RNA genómico (28.5 kb)
POL
S
3b
3a
sM
M
N
7
polìA
1
2
a
1.9
3
4
5
c
4.6
6
7
8
d
9.5
b
12
B DI-B (-10.6 kb)
polìA
1
2
a
1.9
3
4
b
2.8
5
c
4.6
6
7
8
d
1.9
C DI-C (9.7 kb)
polìA
1
2
a
1.9
3
4
b
2.8
5
c
3.5
6
7
8
d
2.1

FIG.10

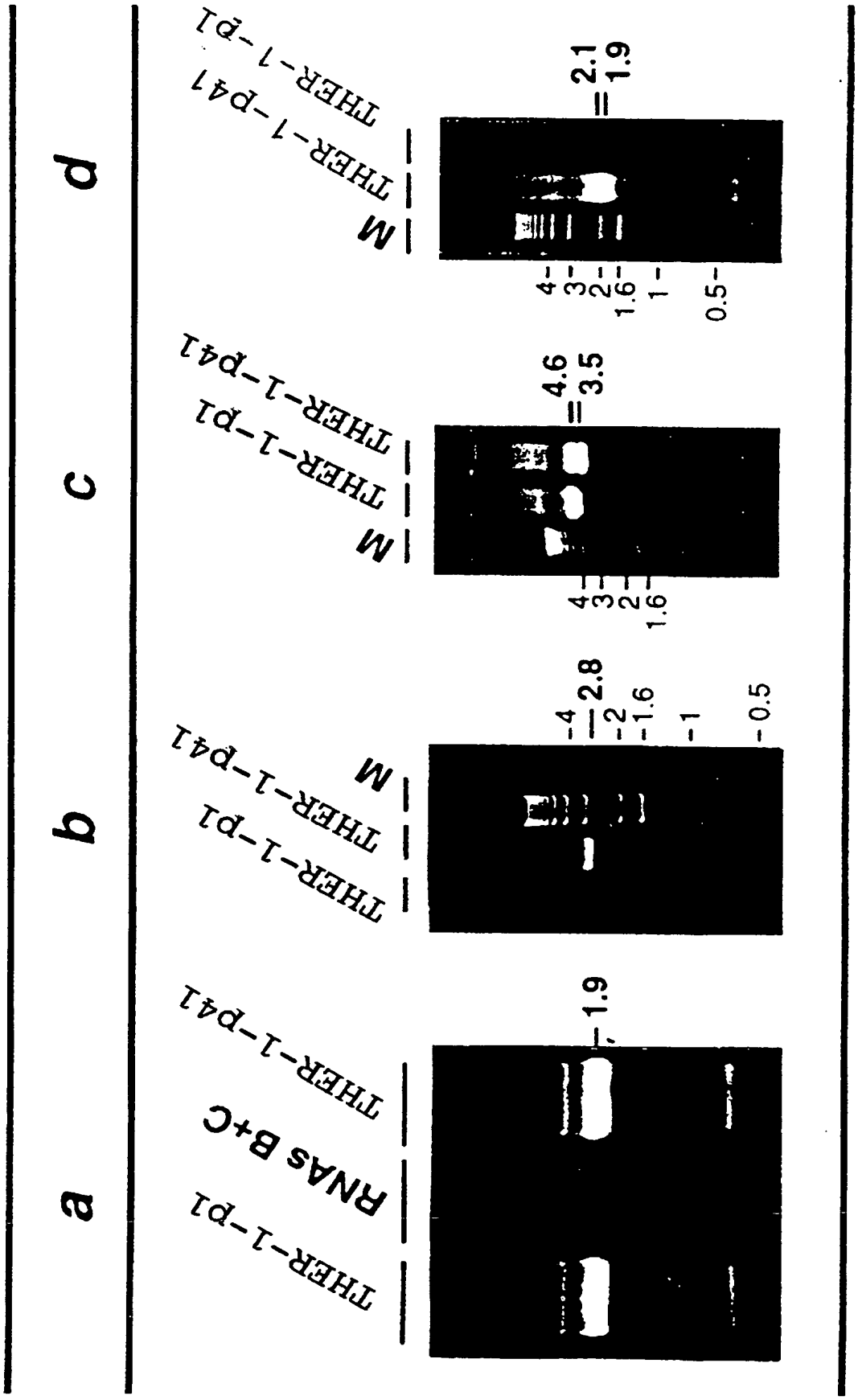


FIG.11

```
NCTTTTAAAGTAAAGTGAGTGTAGCGTGGCTATATCTCTTCTTTTACTTTAACTAGCCTTGTGCTAGATTTTGTCTTCGGACACCAACTC 90

GAACTAAACGAAATATTTGTCTTTCTATGAAATCATAGAGGACAAGCGTTGATTATTTCCATTCAGTTTGGCAATCACTCCTTGGAACGG 180

                          M  K  S  •

GGTTGAGCGAACGGTGCAGTAGGGTTCCGTCCCTATTTCGTAAGTCGCCTAGTAGTAGCGAGTGCGGTTCCGCCCGTACAACGTTGGGTA 270

GACCGGGTTCCGTCCTGTGATCTCCCTCGCCGGCCGCCAGGAGAATGAGTTCCAAACAATTCAAGATCCTTGTTAATGAGGACTATCAAG 360

                                        M  S  S  K  Q  F  K  I  L  V  N  E  D  Y  Q

TCAACGTGCCTAGTCTTCCTATTCGTGACGTGTTACAGGAAATTAAGTACTGCTACCGTAATGGATTTGAGGGCTATGTTTTCGTACCAG 450

V  N  V  P  S  L  P  I  R  D  V  L  Q  E  I  K  Y  C  Y  R  N  G  F  E  G  Y  V  F  V  P

AATACTGTCGTGACCTAGTTGATTGCGATCGTAAGGATCACTACGTCATTGGTGTTCTTGGTAACGGAGTAAGTGATCTTAAACCTGTTC 540

E  Y  C  R  D  L  V  D  C  D  R  K  D  H  Y  V  I  G  V  L  G  N  G  V  S  D  L  K  P  V

TTCTTACCGAACCCTCCGTCATGTTGCAAGGCTTTATTGTTAGAGCTAACTGCAATGGCGTTCTTGAGGACTTTGACCTTAAAATTGCTC 630

L  L  T  E  P  S  V  M  L  Q  G  F  I  V  R  A  N  C  N  G  V  L  E  D  F  D  L  K  I  A

GCACTGTCAGAGGTGCCATATATGTTGATCAATACATGTGTGGTGCTGATGGAAAACCAGTCATTGAAGGCGATTTTAAGGACTACTTCG 720
     G
R  T  V  R  G  A  I  Y  V  D  Q  Y  M  C  G  A  D  G  K  P  V  I  E  G  D  F  K  D  Y  F

GTGATGAAGACATCATTGAATTTGAAGGAGAGGAGTACCATTGCGCTTGGACAACTGTGCGCGATGAGAAACCGCTGAATCAGCAAACTC 810

G  D  E  D  I  I  E  F  E  G  E  E  Y  H  C  A  W  T  T  V  R  D  E  K  P  L  N  Q  Q  T

TCTTTACCATTCAGGAAATCCAATACAATCTGGACATTCCTCATAAATTGCCAAACTGTGCTACTAGACATGTAGCACCACCAGTCAAAA 900

L  F  T  I  Q  E  I  Q  Y  N  L  D  I  P  H  K  L  P  N  C  A  T  R  H  V  A  P  P  V  K
```

FIG. 12/1

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

AGAACTCTAAAATAGTTCTGTCTGAAGATTACAAGAAGCTTTATGATATCTTCGGATCACCCTTTATGGGAAATGGTGACTGTCTTAGCA 990

K N S K I V L S E D Y K K L Y D I F G S P F M G N G D C L S

AATGCTTTGACACTCTTCATTTTATCGCTGCTACTCTTAGATGCCCGTGTGGTTCTGAAAGTAGCGGCGTTGGAGATTGGACTGGTTTTA 1080

K C F D T L H F I A A T L R C P C G S E S S G V G D W T G F

AGACTGCCTGTTGTGGTCTTTCTGGCAAAGTTAAGGGTGTCACTTTGGGTGATATTAAGCCTGGTGATGCTGTTGTCACTAGTATGAGCG 1170

K T A C C G L S G K V K G V T L G D I K P G D A V V T S M S

CAGGTAAGGGAGTTAAGTTCTTTGCCAATTGTGTTCTTCAATATGCTGGTGATGTTGAAGGTGTCTCCATCTGGAAAGTTATTAAAACTT 1260

A G K G V K F F A N C V L Q Y A G D V E G V S I W K V I K T

TTACAGTTGATGAGACTGTATGCACCCCTGGTTTTGAAGGCGAATTGAACGACTTCATCAAACCTGAGAGCAAATCACTAGTTGCATGCA 1350

F T V D E T V C T P G F E G E L N D F I K P E S K S L V A C

GCGTTAAAAGAGCATTCATTACTGGTGATATTGATGATGCTGTACATGATTGTATCATTACAGGAAAATTGGATCTTAGTACCAACCTTT 1440

S V K R A F I T G D I D D A V H D C I I T G K L D L S T N L

TTGGTAATGTTGGTCTATTATTCAAGAAGACTCCATGGTTTGTACAAAAGTGTGGTGCACTTTTTGTAGACGCTTGGAAAGTAGTAGAGG 1530

F G N V G L L F K K T P W F V Q K C G A L F V D A W K V V E

AGCTTTGTGGTTCACTCACACTTACATACAAGCAAATTTATGAAGTTGTAGCATCACTTTGCACTTCTGCTTTTACGATTGTAAACTACA 1620

E L C G S L T L T Y K Q I Y E V V A S L C T S A F T I V N Y

AGCCAACATTTGTGGTTCCAGACAATCGTGTTAAAGATCTTGTAGACAAGTGTGTGAAAGTTCTTGTAAAAGCATTTGATGTTTTTACGC 1710

K P T F V V P D N R V K D L V D K C V K V L V K A F D V F T

FIG. 12/2

AGATTATCACAATAGCTGGTATTGAGGCCAAATGCTTTGTGCTTGGTGCTAAATACCTGTTGTTCAATAATGCACTTGTCAAACTTGTCA 1800

Q I I T I A G I E A K C F V L G A K Y L L F N N A L V K L V

GTGTTAAAATCCTTGGCAAGAAGCAAAAGGGTCTTGAATGTGCATTCTTTGCTACTAGCTTGGTTGGTGCAACTGTTAATGTGACACCTA 1890

S V K I L G K K Q K G L E C A F F A T S L V G A T V N V T P

AAAGAACAGAGACTGCCACTATCAGCTTGAACAAGGTTGATGATGTTGTAGCACCAGGAGAGGGTTATATCGTCATTGTTGGTGATATGG 1980

K R T E T A T I S L N K V D D V V A P G E G Y I V I V G D M

CTTTCTACAAGAGTGGTGAATATTATTTCATGATGTCTAGTCCTAATTTTGTTCTTACTAACAATGTTTTTAAAGCAGTTAAAGTTCCAT 2070

A F Y K S G E Y Y F M M S S P N F V L T N N V F K A V K V P

CTTATGACATCGTTTATGATGTTGATAATGATACCAAAAGCAAAATGATTGCAAAACTTGGTTCATCATTTGAACAAATACCAACTGGCA 2160

I ◀—▶ II

S Y D I V Y D V D N D T K S K M I A K L G S S F E Q I P T G

CACAAGATCCAATTCGGTTCTGTATTGAAAATGAAGTTTGTGTTGTCTGTGGTTGTTGGCTTAACAATGGTTGCATGTGCGATCGTACTT 2250

T Q D P 1 R F C I E N E V C V V C G C W L N N G C M C D R T

CTATGCAGAGTTTTACTGTTGATCAAAGTTATTTAAACGAGTGCGCGGTTCTAGTGCAGCTCGACTAGAACCCTGCAATGGTACTGATCC 2340

• S K L F K R V R G S S A A R L E P C N G T D P

S M Q S F T V D Q S Y L N E C G V L V Q L D •

AGACCATGTTAGTAGAGCTTTTGACATCTACAACAAAGATGTTGCGTGTATTGGTAAATTCCTTAAGACGAATTGTTCAAGATTTAGGAA 2430

D H V S R A F D I Y N K D V A C I G K F L K T N C S R F R N

TTTGGACAAACATGATGCCTACTACATTGTCAAACGTTGTACAAAGACCGTTATGGACCATGAGCAAGTCTGTTATAACGATCTTAAAGA 2520

L D K H D A Y Y I V K R C T K T V M D H E Q V C Y N D L K D

FIG. 12/3

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

TTCTGGTGCTGTTGCTGAGCATGACTTCTTCACATATAAAGAGGGTAGATGTGAGTTCGGTAATGTTGCACGTAGGAATCTTACAAAGTA 2610
S G A V A E H D F F T Y K E G R C E F G N V A R R N L T K Y

CACAATGATGGATCTTTGTTACGCTATCAGAAATTTTGATGAAAAGAACTGTGAAGTTCTCAAAGAAATACTCGTGACAGTAGGTGCTTG 2700
T M M D L C Y A I R N F D E K N C E V L K E I L V T V G A C

CACTGAAGAATTCTTTGAAAATAAAGATTGGTTTGATCCAGTTGAAAATGAAGCCATACATGAAGTTTATGCAAAACTTGGACCCATTGT 2790
T E E F F E N K D W F D P V E N E A I H E V Y A K L G P I V

AGCCAATGCTATGCTTAAATGTGTTGCTTTTTGCGATGCGATAGTGGAAAAAGGCTATATAGGTGTTATAACACTTGACAACCAAGATCT 2880
A N A M L K C V A F C D A I V E K G Y I G V I T L D N Q D L

TAATGGCAATTTCTACGATTTCGGCGATTTCGTGAAGACTGCTCCGGGTTTTGGTTGCGCTTGTGTTACATCATATTATTCTTATATGAT 2970
N G N F Y D F G D F V K T A P G F G C A C V T S Y Y S Y M M

GCCTTTAATGGGGATGACTTCATGCTTAGAGTCTGAAAACTTTGTGAAAAGTGACATCTATGGTTCTGATTATAAGCAGTATGATTTACT 3060
P L M G M T S C L E S E N F V K S D I Y G S D Y K Q Y D L L

AGCTTATGATTTTACCGAACATAAGGAGTACCTTTTCCAAAAATACTTTAAGTACTGGGATCGCACATATCACCCAAATTGTTCTGATTG 3150
A Y D F T E H K E Y L F Q K Y F K Y W D R T Y H P N C S D C

TACTAGTGACGAGTGTATTATTCATTGTGCTAATTTTAACACATTGTTTTCTATGACAATACCAATGACAGCTTTTGGACCACTTGTCCG 3240
T S D E C I I H C A N F N T L F S M T I P M T A F G P L V R

TAAAGTTCATATTGATGGTGTACCAGTAGTTGTTACTGCAGGTTACCATTTCAAACAACTTGGTATAGTATGGAATCTTGATGTAAAATT 3330
K V H I D G V P V V V T A G Y H F K Q L G I V W N L D V K L

AGACACAATGAAGTTGAGCATGACTGATCTTCTTAGATTTGTCACAGATCCAACACTTCTTGTAGCATCAAGCCCTGCACTTTTAGACCA 3420
D T M K L S M T D L L R F V T D P T L L V A S S P A L L D Q

FIG. 12/4

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

GCGTACTGTCTGTTTCTCCATTGCAGCTTTGAGTACTGGTATTACATATCAGACAGTAAAACCAGGTCACTTTAACAAGGATTTCTACGA 3510
R T V C F S I A A L S T G I T Y Q T V K P G H F N K D F Y D

TTTCATAACAGAGCGTGGATTCTTTGAAGAGGGATCTGAGTTAACATTAAAACATTTTTTCTTTGCACAGGGTGGTGAAGCTGCTATGAC 3600
F I T E R G F F E E G S E L T L K H F F F A Q G G E A A M T

AGACTTCAATTATTATCGCTACAATAGAGTCACAGTACTTGATATTTGCCAAGCTCAATTTGTTTACAAAATAGTTGGCAAGTATTTTGA 3690
D F N Y Y R Y N R V T V L D I C Q A Q F V Y K I V G K Y F E

ATGTTATGACGGTGGGTGCATTAATGCTCGTGAAGTTGTTGTTACAAACTATGACAAGAGTGCTGGCTATCCTTTGAACAAATTTGGTAA 3780
C Y D G G C I N A R E V V V T N Y D K S A G Y P L N K F G K

AGCTAGACTTTACTACGAAACTCTTTCATATGAAGAGCAGGATGCACTTTTTGCTTTAACAAAGACAAATGTTTTACCCACAATGACTCA 3870
A R L Y Y E T L S Y E E Q D A L F A L T K R N V L P T M I Q

AATGAATTTGAAATACGCTATTTCTGGTAAGGCAAGAGCTCGTACAGTAGGAGGAGTTTCACTTCTTTCTACCATGACTACGAGACAATA 3960
M N L K Y A I S G K A R A R T V G G V S L L S T M I T R Q Y

TCATCAGAAGCATTTGAAGTCAATTGCTGCAACACGCAATGCTACTGTGGTCATTGGTTCAACCAAGTTTTATGGTGGTTGGGACAATAT 4050
H Q K H L K S I A A T R N A T V V I G S T K F Y G G W D N M

GCTTAAAAATTTAATGCGTGATGTTGATAATGGTTGTTTGATGGGATGGGACTATCCTAAGTGTGACCGTGCTTTACCTAATATGATTAG 4140
L K N L M R D V D N G C L M G W D Y P K C D R A L P N M I R

AATGGCTTCTGCCATGATATTAGGTTCTAAGCATGTTGGTTGTTGTACACATAATGATAGGTTCTACCGCCTCTCCAATGAGTTAGCTCA 4230
M A S A M I L G S K H V G C C T H N D R F Y R L S N E L A Q

FIG. 12/5

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

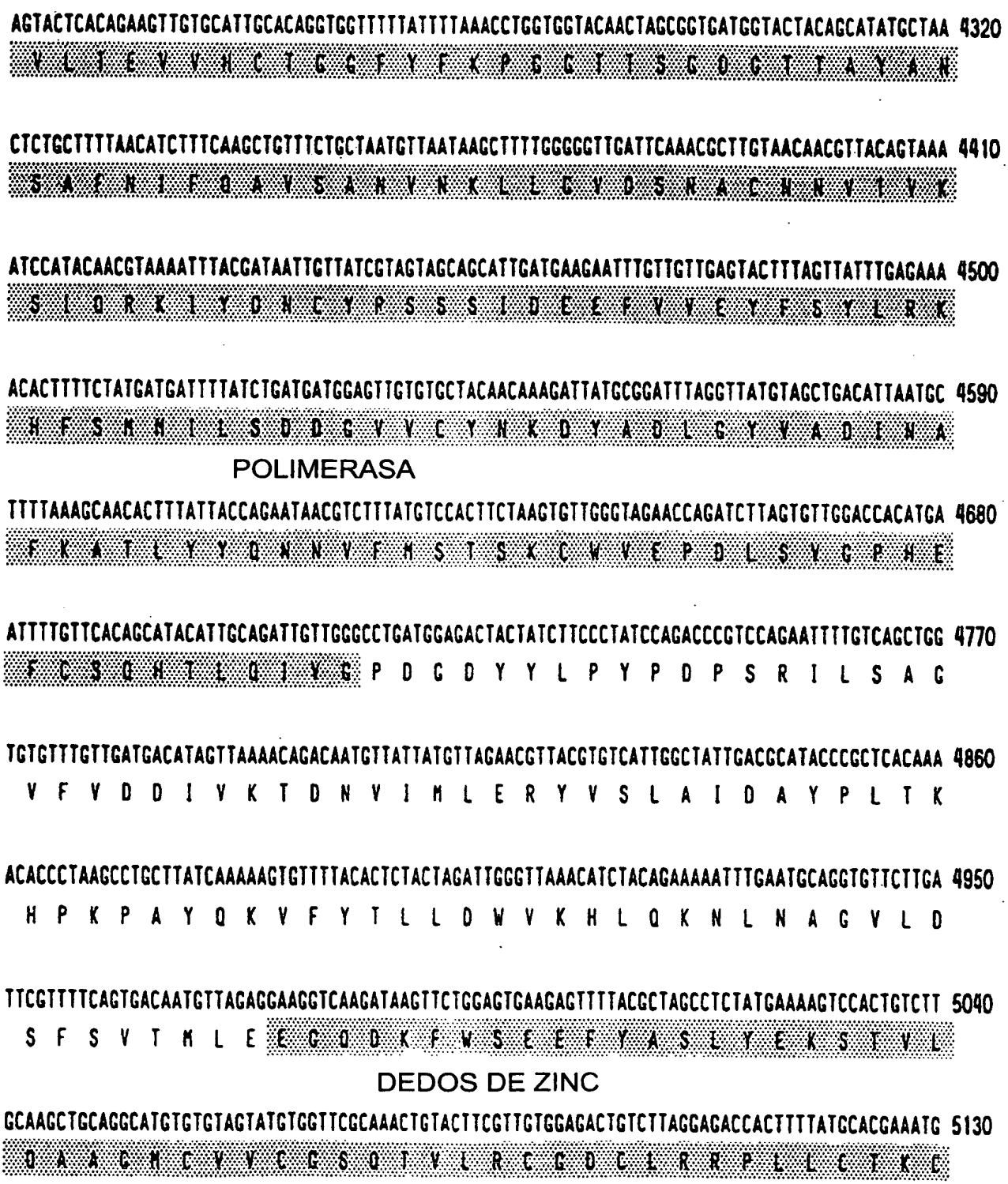


FIG. 12/6

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

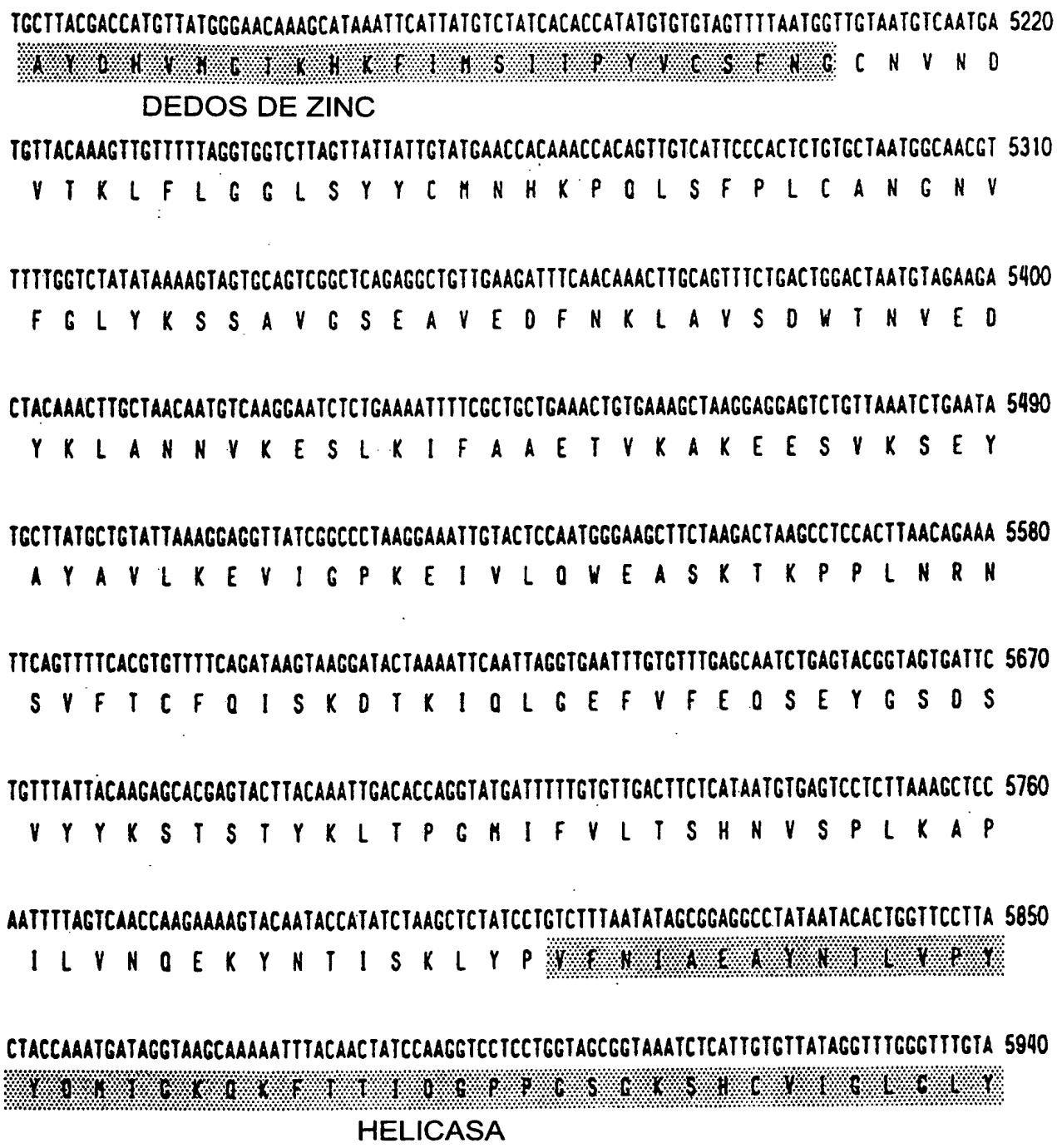


FIG. 12/7

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

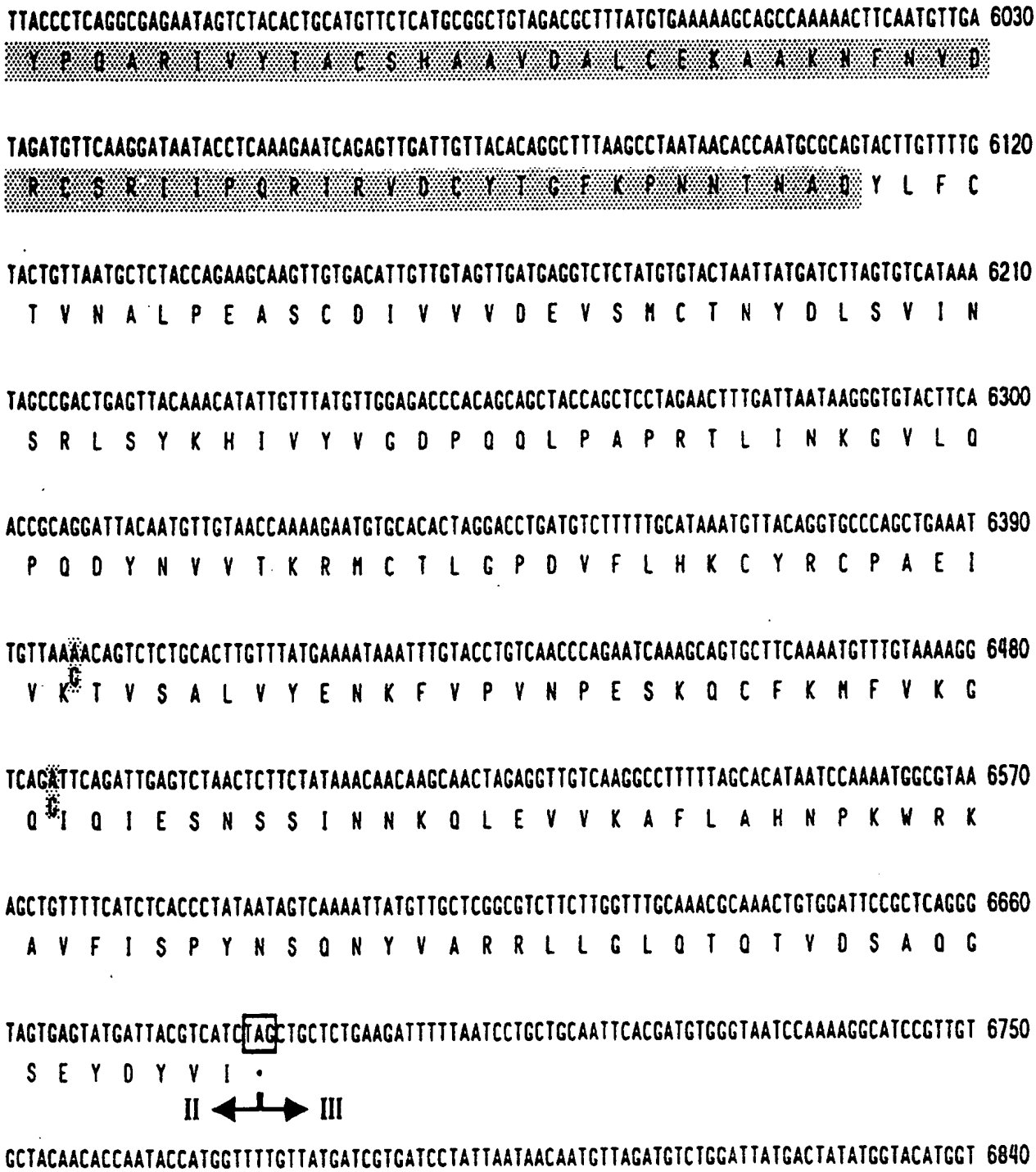


FIG. 12/8

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

CAAATGAATGGTCTTATGTTATTTTGGAACTGTAATGTAGACATGTACCCAGAGTTTTCAATTGTTTGTAGATTTGATACTCGCACTCGC 6930

TCTAAATTGTCTTTAGAAGGTTGTAATGGTGGTGCATTGTATGTTAATAACCATGCTTTCCACACACCAGCTTATGATAGAAGAGCTTTT 7020

GCTAAGCTTAAACCTATGCCATTCTTTTACTATGATGATAGTAATTGTGAACTTGTTGATGGGCAACCTAATTATGTACCACTTAAGTCA 7110

AATGTTTGCATAACAAAATGCAACATTGGTGGTGCTGTCTGCAAGAAGCATGCTGCTCTTTACAGAGCGTATGTTGAGGATTACAACATT 7200

TTTATGCAGGCTGGTTTTACAATATGGTGTCCTCAAAACTTTGACACCTATATGCTTTGGCATGGTTTTGTTAATAGCAAAGCACTTCAG 7290

AGTCTAGAAAATGTGGCTTTTAATGTCGTTAAGAAAGGTGCCTTCACCGGTTTAAAAGGTGACTTACCAACTGCTGTTATTGCTGACAAA 7380

ATAATGGTAAGAGATGGACCTACTGACAAATGTATTTTTACAAATAAGACTAGTTTACCTACAAATGTAGCTTTTGAGTTATATGCAAAA 7470

CGCAAACTTGGACTCACACCTCCATTAACAATACTTAGGAATTTAGGTGTTGTCGCAACATATAAGTTTGTGTTGTGGGATTATGAAGCT 7560

GAACGTCCTTTCTCAAATTTCACTAAGCAAGTGTGTTCCTACACTGATCTTGATAGTGAAGTTGTAACATGTTTTGATAATAGTATTGCT 7650

GGCTCTTTTGAGCGTTTTACTACTACAAGAGATGCAGTGCTTATTTCTAATAACGCTGTGAAAGGGCTTAGTGCCATTAAATTACAATAT 7740

GGCCTTTTGAATGATCTACCTGTAAGTACTGTTGGAAATAAACCTGTCACATGGTATATCTATGTGCGCAACAATGGTGAGTACGTCGAA 7830

CAAATCGATAGTTACTATACACAGGGACGTACTTTTGAAACCTTCAAACCTCGTAGTACAATGGAAGAAGATTTTCTTAGTATGGATACT 7920

ACACTCTTCATCCAAAAGTATGGTCTTGAGGATTATGGTTTTGAACACGTTGTATTTGGAGATGTCTCTAAAACTACCATTGGTGGTATG 8010

CATCTTCTTATATCGCAAGTGCGCCTTGCAAAAATGGGTTTGTTTTCCGTTCAAGAATTTATGAATAATTCTGACAGTACACTGAAAAGT 8100

TGTTGTATTACATATGCTGATGATCCATCTTCTAAGAATGTGTGCACTTATATGGACATACTCTTGGACGATTTTGTGACTATCATTAAG 8190

AGCTTAGATCTTAATGTTGTGTCCAAAGTTGTGGATGTCATTGTAGATTGTAAGGCATGGAGATGGATGTTGTGGTGTGAGAATTCACAT 8280

ATTAAAACCTTCTATCCACAACTCCAATCTGCTGAATGGAATCCCGGCTATAGCATGCCTACACTGTACAAAATCCAGCGTATGTGTCTC 8370

GAACGGTGTAATCTCTACAATTATGGTGCACAAGTGAAATTACCTGATGGCATTACTACTAATGTCGTTAAGTATACTCAGTTGTGTCAA 8460

TACCTTAACACTACTACATTGTGTGTACCACACAAAATGCGTGTATTGCATTTAGGAGCTGCTGGTGCATCTGGTGTTGCTCCTGGTAGT 8550

ACTGTATTAAGAAGATGGTTACCAGATGATGCCATATTGGTTGATAATGATTTGAGAGATTACGTTTCCGACGCAGACTTCAGTGTTACA 8640

FIG. 12/9

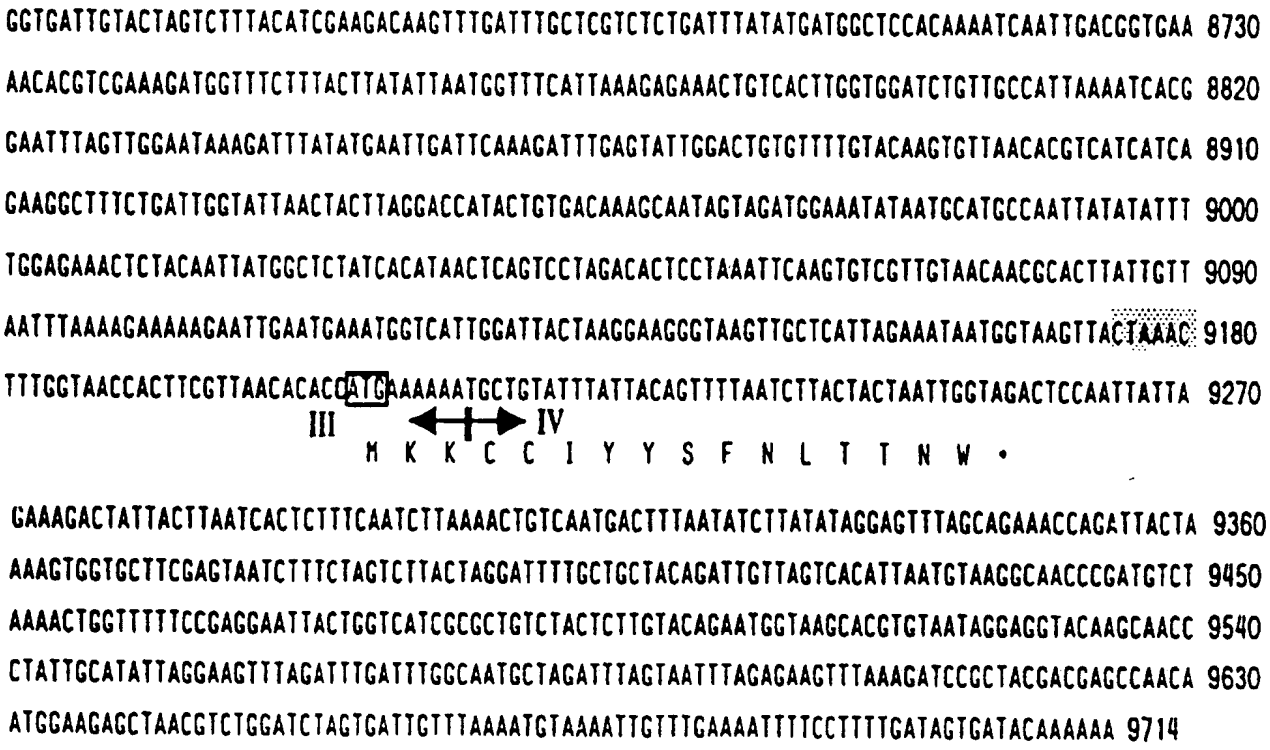

GGTGATTGTACTAGTCTTTACATCGAAGACAAGTTTGATTTGCTCGTCTCTGATTTATATGATGGCTCCACAAAATCAATTGACGGTGAA 8730
AACACGTCGAAAGATGGTTTCTTTACTTATATTAATGGTTTCATTAAAGAGAAACTGTCACTTGGTGGATCTGTTGCCATTAAAATCACG 8820
GAATTTAGTTGGAATAAAGATTTATATGAATTGATTCAAAGATTTGAGTATTGGACTGTGTTTTGTACAAGTGTTAACACGTCATCATCA 8910
GAAGGCTTTCTGATTGGTATTAACTACTTAGGACCATACTGTGACAAAGCAATAGTAGATGGAAATATAATGCATGCCAATTATATATTT 9000
TGGAGAAACTCTACAATTATGGCTCTATCACATAACTCAGTCCTAGACACTCCTAAATTCAAGTGTCGTTGTAACAACGCACTTATTGTT 9090
AATTTAAAAGAAAAAGAATTGAATGAAATGGTCATTGGATTACTAAGGAAGGGTAAGTTGCTCATTAGAAATAATGGTAAGTTACTAAAC 9180
TTTGGTAACCACTTCGTTAACACACGATGAAAAAATGCTGTATTTATTACAGTTTTAATCTTACTACTAATTGGTAGACTCCAATTATTA 9270
III
IV
M K K C C I Y Y S F N L T T N W •
GAAAGACTATTACTTAATCACTCTTTCAATCTTAAAACTGTCAATGACTTTAATATCTTATATAGGAGTTTAGCAGAAACCAGATTACTA 9360
AAAGTGGTGCTTCGAGTAATCTTTCTAGTCTTACTAGGATTTTGCTGCTACAGATTGTTAGTCACATTAATGTAAGGCAACCCGATGTCT 9450
AAAACTGGTTTTTCCGAGGAATTACTGGTCATCGCGCTGTCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGCAACC 9540
CTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATTTAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTACGACGAGCCAACA 9630
ATGGAAGAGCTAACGTCTGGATCTAGTGATTGTTTAAAATGTAAAATTGTTTGAAAATTTTCCTTTTGATAGTGATACAAAAAA 9714

FIG. 12/10

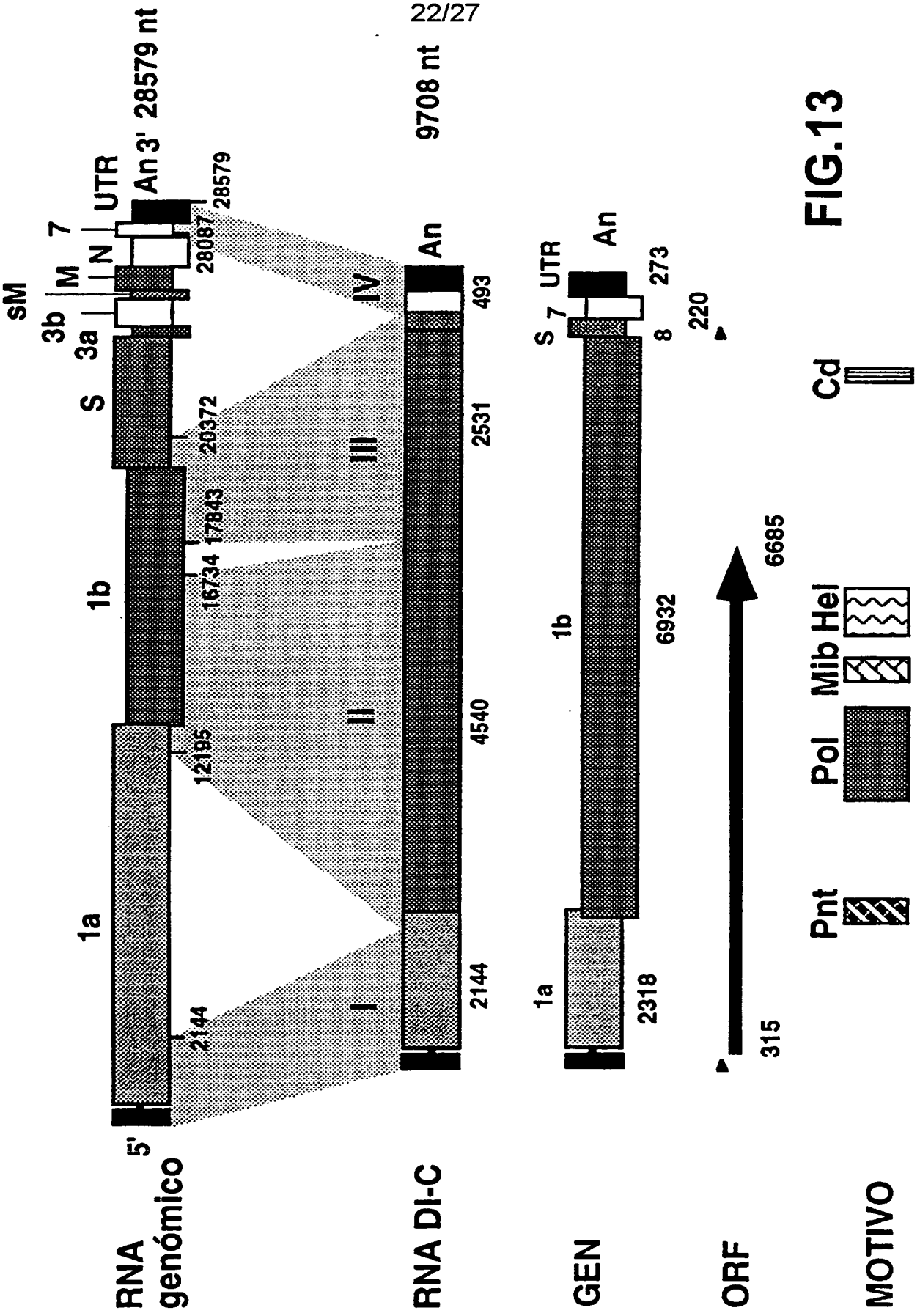

RNA genómico
5'
1a
1b
3a
3b
M
N
7
UTR
An 3' 28579 nt
sM
S
2144
12195
16734
17843
20372
28087
28579
RNA DI-C
9708 nt
I
II
III
IV
An
2144
4540
2531
493
GEN
1a
1b
S
7
8
UTR
An
2318
6932
273
220
ORF
315
6685
MOTIVO
Pnt
Pol
Mib
Hel
Cd

FIG.13

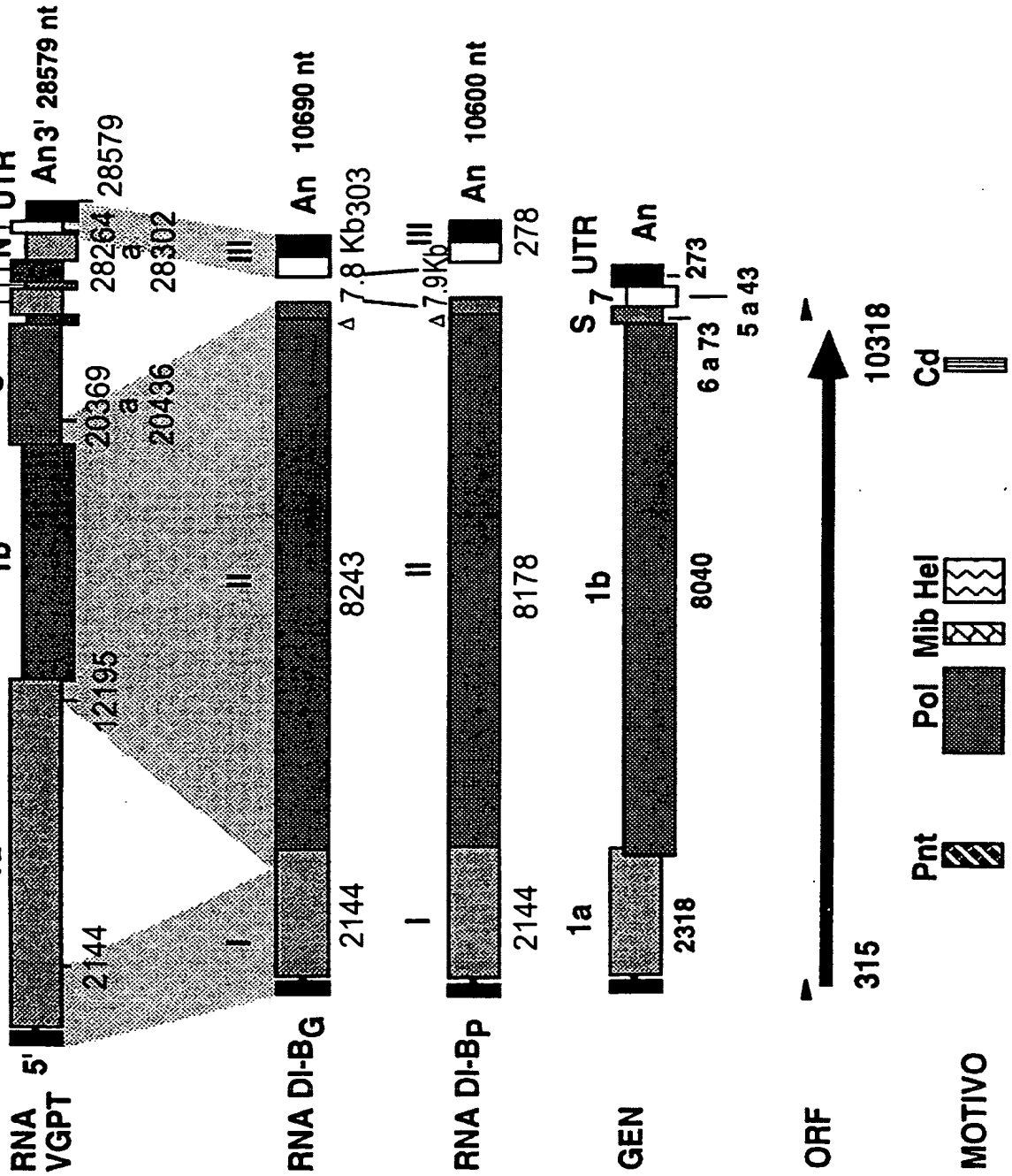

RNA VGPT
5'
1a
2144
1b
12195
S
3b
3a
sM
M
7
N
UTR
An 3' 28579 nt
20369
a
20436
28264
a
28302
28579
II
I
III
RNA DI-BG
2144
8243
An 10690 nt
Δ 7.8 Kb
303
RNA DI-BP
2144
8178
An 10600 nt
Δ 7.9Kb
278
GEN
1a
2318
1b
8040
S 7
UTR
An
273
6 a 73
5 a 43
ORF
315
10318
MOTIVO
Pnt
Pol
Mib Hel
Cd

FIG.14

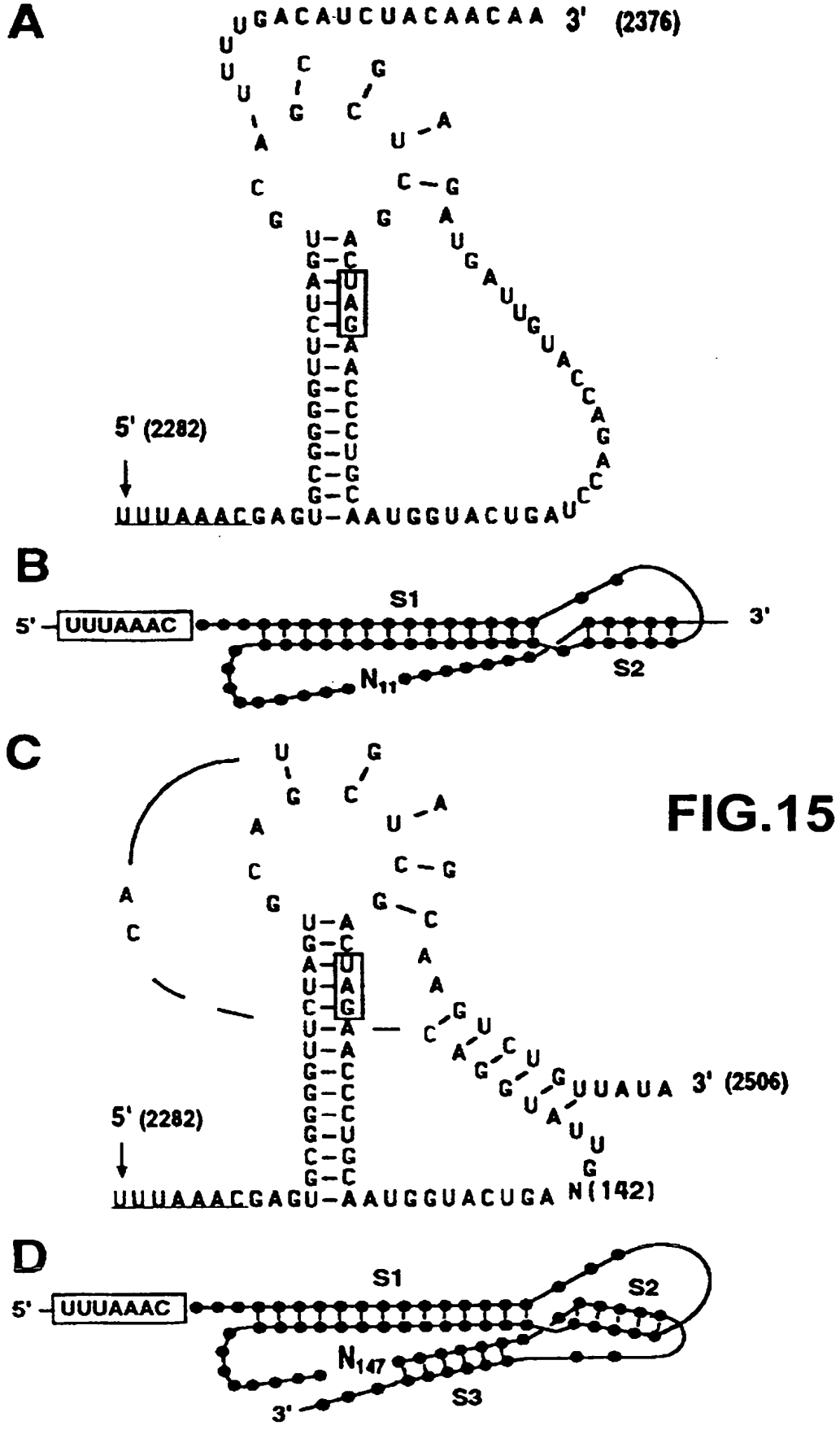

A
UGACAUCUACAACAA 3' (2376)
5' (2282)
UUUAAACGAGU-AAUGGUACUGAU
B
S1
5' UUUAAAC
3'
S2
N11
C
5' (2282)
UUUAAACGAGU-AAUGGUACUGA N(142)
UUAUA 3' (2506)
D
S1
S2
5' UUUAAAC
N147
S3
3'

FIG.15

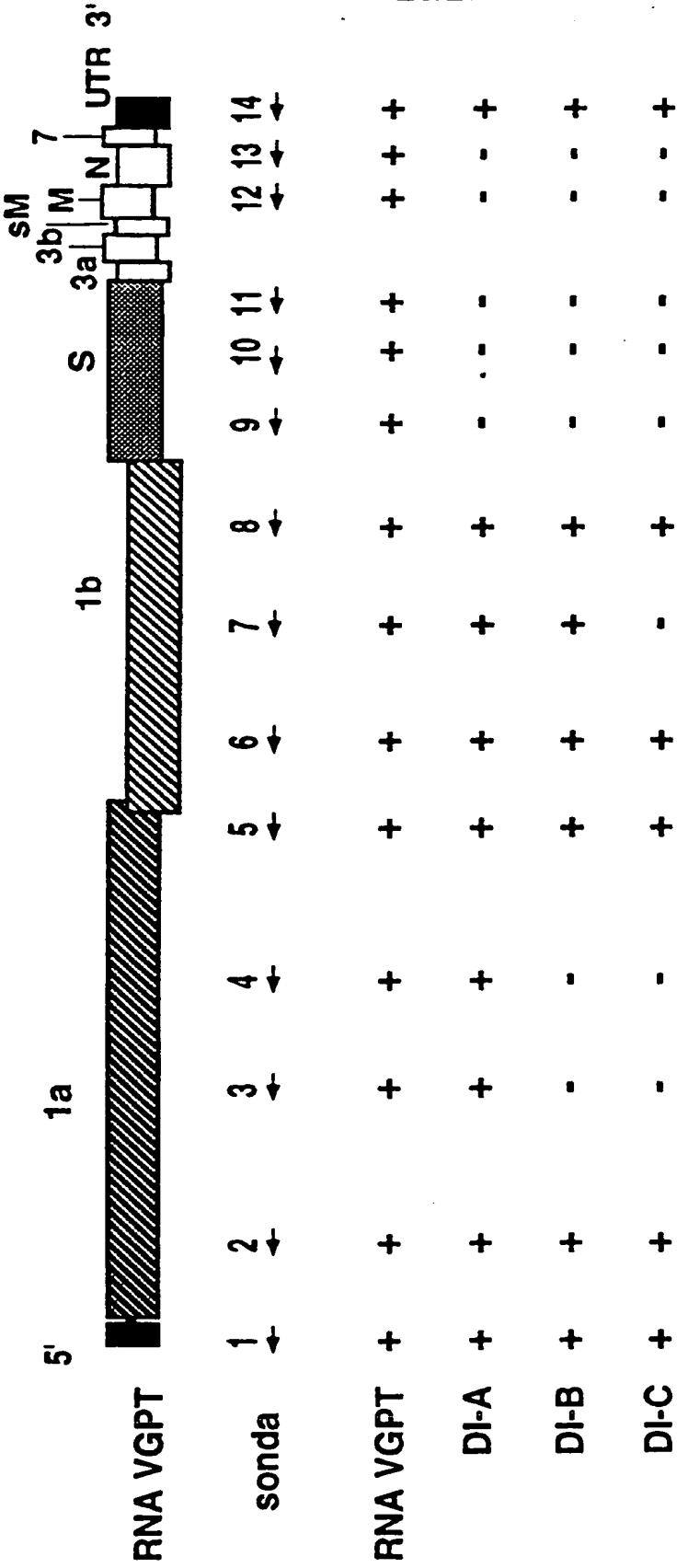

5'
1a
1b
S
3a
3b
M
sM
N
7
UTR 3'
RNA VGPT
sonda
RNA VGPT
DI-A
DI-B
DI-C
sonda
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
+
-
9-13
3, 4
1,2,5,6,8,14
7
1

FIG.16

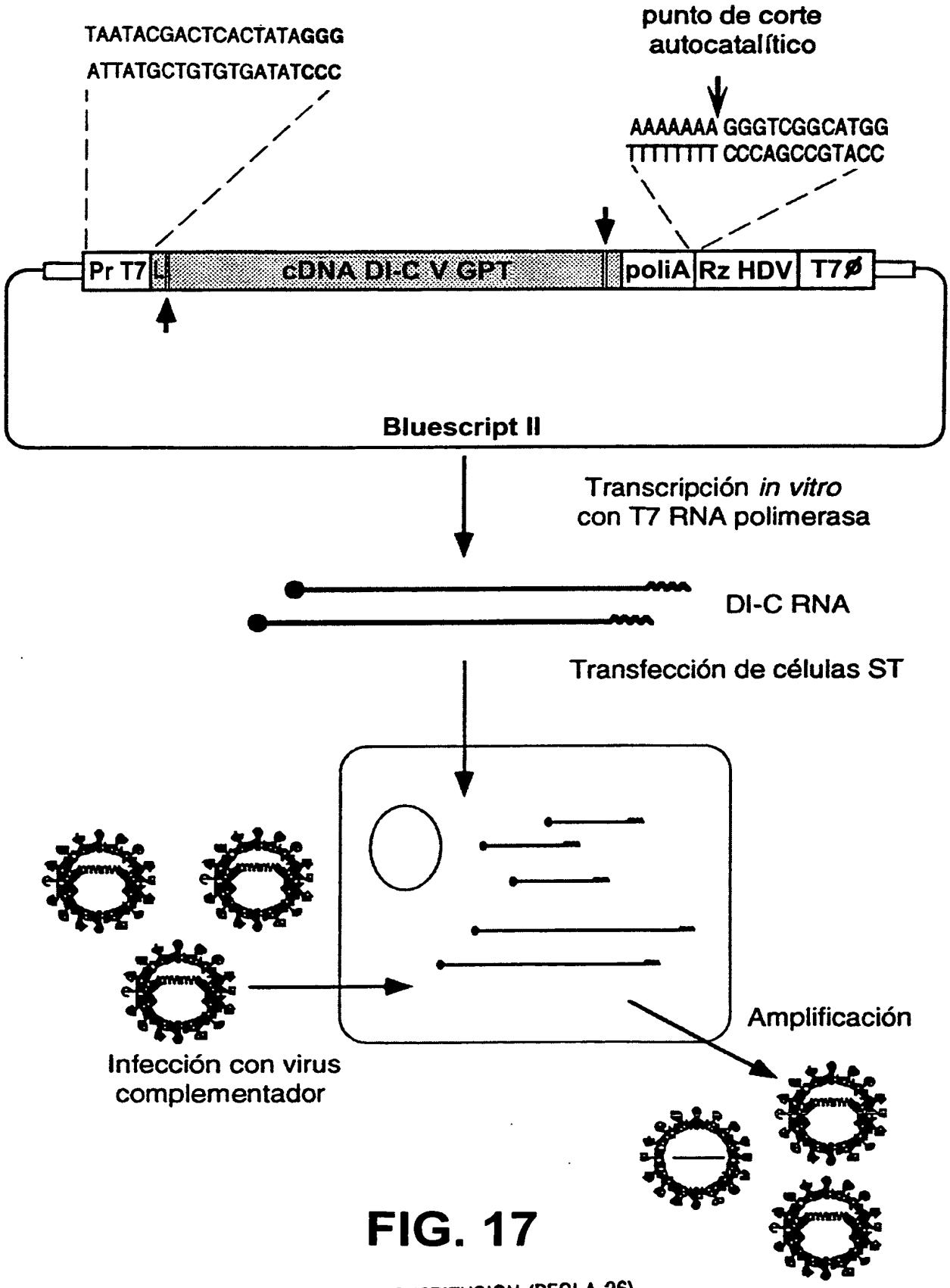

TAATACGACTCACTATAGGG
ATTATGCTGTGTGATATCCC
punto de corte
autocatalítico
AAAAAAA GGGTCGGCATGG
TTTTTTTT CCCAGCCGTACC
Pr T7
cDNA DI-C V GPT
poliA
Rz HDV
T7ø
Bluescript II
Transcripción in vitro
con T7 RNA polimerasa
DI-C RNA
Transfección de células ST
Amplificación
Infección con virus
complementador

FIG. 17

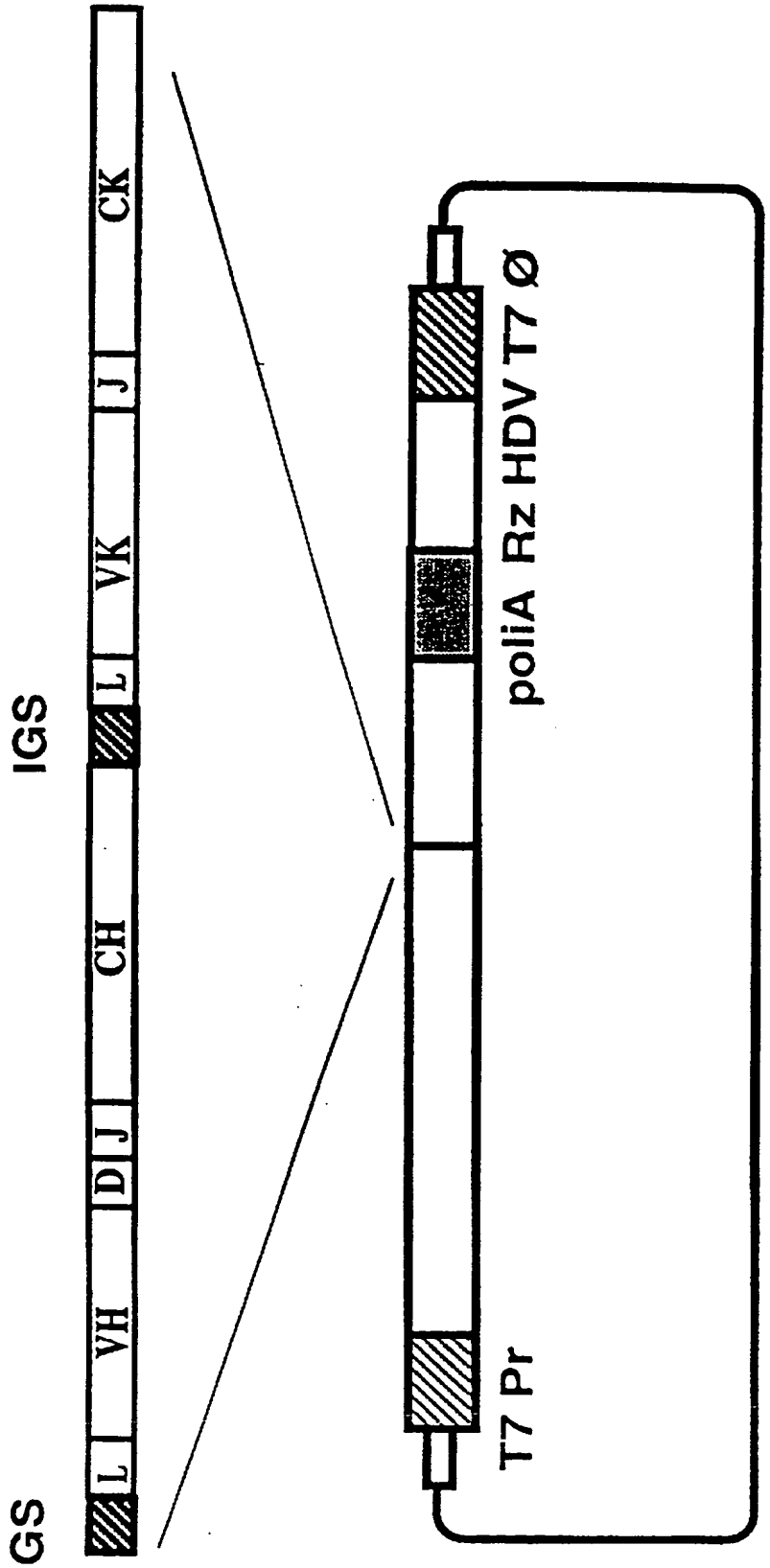


FIG.18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interna al Application No
PCT/ES 97/00059

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/86 C12N7/01 A61K39/225 A61K39/215 A61K35/76

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 91 03552 A (THE MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) 21 March 1991	1,2, 6-12, 14-18, 20-25, 39,40
Y	see page 11, line 17 - page 12, line 17 see page 22, line 10 - page 28, line 7 see page 29, line 30 - page 36, line 6 see page 38, line 1 - page 43, line 35; example 7	28, 30-32, 34-36, 38-40,42

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
2 July 1997	31.07.97

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Montero Lopez, B

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/ES 97/00059

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VIROLOGY, vol. 208, no. 1, 1 April 1995, ORLANDO US, pages 319-327, XP002034204 GHING-LEN LIAO: "Coronavirus Defective-Interfering RNA as an expression vector: The generation of a pseudorecombinant Mouse Hepatitis Virus expressing Hemagglutinin-Esterase"	1-3,6,7, 11, 14-17, 20-24,44
Y	see abstract see page 319, right-hand column, paragraph 2 - page 320, left-hand column, paragraph 2 see page 321, right-hand column, paragraph 3 - page 324, left-hand column, paragraph 1 see page 325, left-hand column, paragraph 1 - page 326, left-hand column, paragraph 2	28, 30-32, 34-36, 38-40, 42,45

X	ADV. EXP. MED. BIOL. (1995), 380(CORONA-AND RELATED VIRUSES), 583-9 CODEN: AEMBAP;ISSN: 0065-2598, 1995, XP002034205 MENDEZ, ANA ET AL: "Structure and encapsidation of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) defective interfering genomes" see abstract see page 585, paragraph 3 - page 588, paragraph 6	1,3-6

X	J. VIROL. (1991), 65(6), 3219-26 CODEN: JOVIAM;ISSN: 0022-538X, 1991, XP002034206 VAN DER MOST, ROBBERT G. ET AL: "A domain at the 3' end of the polymerase gene is essential for encapsidation of coronavirus defective interfering RNAs" see abstract see page 3220, right-hand column, last paragraph - page 3225, right-hand column, paragraph 1	1,3,6

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern al Application No
PCT/ES 97/00059

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 94 17098 A (INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA) 4 August 1994 see page 1, line 17 - page 8, line 7 see page 9, paragraph 12 - page 15, paragraph 19; claims	28, 30-32, 34-36, 38-40, 42,45
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, no. 12, December 1994, pages 8223-8231, XP002034207 RUEY-YI CHANG ET AL.: "A cis-acting function for the Coronavirus leader in defective interfering RNA replication" see abstract see page 8225, right-hand column, last paragraph - page 8230, right-hand column, paragraph 2	1-45
P,X	VIROLOGY, vol. 217, no. 2, 15 March 1996, ORLANDO US, pages 495-507, XP002034208 ANA MENDEZ ET AL.: "Molecular characterization of transmissible gastroenteritis Coronavirus defective interfering genomes: Packaging and heterogeneity" see abstract see page 498, left-hand column, last paragraph - page 505, right-hand column, paragraph 4	1-45

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Interr ıal Application No
PCT/ES 97/00059

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9103552 A	21-03-91	US 5166057 A	24-11-92
		AT 126272 T	15-08-95
		AU 636916 B	13-05-93
		AU 6411890 A	08-04-91
		DE 69021575 D	14-09-95
		DE 69021575 T	14-12-95
		EP 0490972 A	24-06-92
		ES 2075901 T	16-10-95
		GR 90100639 A	30-12-91
		JP 5500607 T	12-02-93
		US 5252289 A	12-10-93
		US 5578473 A	26-11-96
WO 9417098 A	04-08-94	ES 2065254 A	01-02-95
		ES 2089966 A	01-10-96
		AU 7004894 A	15-08-94
		CA 2132742 A	24-07-94
		EP 0647655 A	12-04-95
		NZ 259882 A	24-03-97

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ES 97/00059

A. CLASIFICACION DE LA INVENCION
CIP 6 C12N15/86 C12N7/01 A61K39/225 A61K39/215 A61K35/76

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

B . SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
CIP 6 C12N C07K A61K

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	WO 91 03552 A (THE MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) 21 Marzo 1991	1,2, 6-12, 14-18, 20-25, 39,40
Y	ver página 11, línea 17 - página 12, línea 17 ver página 22, línea 10 - página 28, línea 7 ver página 29, línea 30 - página 36, línea 6 ver página 38, línea 1 - página 43, línea 35; ejemplo 7 --- -/--	28, 30-32, 34-36, 38-40,42

[X] En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales

[X] Véase el Anexo de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente

"E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma

"L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internaciónal, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentatión internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención

"X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente

"Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reinvindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional	Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional
2 Julio 1997	31.07.97

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional	Funcionario autorizado
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Montero Lopez, B

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (Julio de 1992)

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solici' nternacional N°
PCT/ES 97/00059

C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría°	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	VIROLOGY, vol. 208, num. 1, 1 Abril 1995, ORLANDO US, páginas 319-327, XP002034204 GHING-LEN LIAO: "Coronavirus Defective-Interfering RNA as an expression vector: The generation of a pseudorecombinant Mouse Hepatitis Virus expressing Hemagglutinin-Esterase"	1-3,6,7, 11, 14-17, 20-24,44
Y	ver resumen ver página 319, columna derecha, párrafo 2 - página 320, columna izquierda, párrafo 2 ver página 321, columna derecha, párrafo 3 - página 324, columna izquierda, párrafo 1 ver página 325, columna izquierda, párrafo 1 - página 326, columna izquierda, párrafo 2	28, 30-32, 34-36, 38-40, 42,45

X	ADV. EXP. MED. BIOL. (1995), 380(CORONA-AND RELATED VIRUSES), 583-9 CODEN: AEMBAP;ISSN: 0065-2598, 1995, XP002034205 MENDEZ, ANA ET AL: "Structure and encapsidation of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) defective interfering genomes" ver resumen ver página 585, párrafo 3 - página 588, párrafo 6	1,3-6

X	J. VIROL. (1991), 65(6), 3219-26 CODEN: JOVIAM;ISSN: 0022-538X, 1991, XP002034206 VAN DER MOST, ROBBERT G. ET AL: "A domain at the 3' end of the polymerase gene is essential for encapsidation of coronavirus defective interfering RNAs" ver resumen ver página 3220, columna derecha, ultimo párrafo - página 3225, columna derecha, párrafo 1	1,3,6

Y	WO 94 17098 A (INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA) 4 Agosto 1994 ver página 1, línea 17 - página 8, línea 7 ver página 9, párrafo 12 - página 15, párrafo 19; reivindicaciones	28, 30-32, 34-36, 38-40, 42,45

	-/--	

1

Formulario PCT/ISA/210 (continuación de la segunda hoja) (Julio de 1992)

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°
PCT/ES 97/00059

C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría°	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, num. 12, Diciembre 1994, páginas 8223-8231, XP002034207 RUEY-YI CHANG ET AL.: "A cis-acting function for the Coronavirus leader in defective interfering RNA replication" ver resumen ver página 8225, columna derecha, ultimo párrafo - página 8230, columna derecha, párrafo 2 ---	1-45
P,X	VIROLOGY, vol. 217, num. 2, 15 Marzo 1996, ORLANDO US, páginas 495-507, XP002034208 ANA MENDEZ ET AL.: "Molecular characterization of transmissible gastroenteritis Coronavirus defective interfering genomes: Packaging and heterogeneity" ver resumen ver página 498, columna izquierda, ultimo párrafo - página 505, columna derecha, párrafo 4 -----	1-45

Formulario PCT/ISA/210 (continuación de la segunda hoja) (Julio de 1992)

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información sobre miembros de la familia de patentes

Solicit ternacional N°
PCT/ES 97/00059

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9103552 A	21-03-91	US 5166057 A	24-11-92
		AT 126272 T	15-08-95
		AU 636916 B	13-05-93
		AU 6411890 A	08-04-91
		DE 69021575 D	14-09-95
		DE 69021575 T	14-12-95
		EP 0490972 A	24-06-92
		ES 2075901 T	16-10-95
		GR 90100639 A	30-12-91
		JP 5500607 T	12-02-93
		US 5252289 A	12-10-93
		US 5578473 A	26-11-96
WO 9417098 A	04-08-94	ES 2065254 A	01-02-95
		ES 2089966 A	01-10-96
		AU 7004894 A	15-08-94
		CA 2132742 A	24-07-94
		EP 0647655 A	12-04-95
		NZ 259882 A	24-03-97